



*Wirkung von östrogenen Substanzen auf
Veränderungen des Stoffwechsels im Tiermodell
der Aromatase knockout Maus*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
an der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Dipl. Ernährungswissenschaftlerin Manuela Bader

Geboren am 09. September 1976 in Halle/Saale

Eingereicht am 01. Februar 2012

Verteidigt am 07. Mai 2012

Wissenschaftliche Betreuung: *Prof. Dr. rer. nat. Günter Vollmer*
Dr. rer. nat. Jannette Wober
(Institut für Zoologie, TU Dresden)

Gutachter: *Prof. Dr. Günter Vollmer*
Institut für Zoologie,
Technische Universität Dresden

Prof. Dr. Dr. Gabriele I. Stangl
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

*Für
Meine Eltern*

Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.

Max Planck

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen als solche kenntlich gemacht.

Bei der Aufarbeitung und Auswertung des von mir gewonnenen Untersuchungsgutes haben mich die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich unterstützt.

1.) Bei den Untersuchungen der Gegenüberstellung der Empfindlichkeit von Wildtyp-Mäusen und Aromatase-knockout (ArKO)-Mäusen auf eine Östrogen-Substitution am Beispiel von infrarenalem Fett hat mich *Susann Ludwig* im Rahmen eines vierwöchigen, durch mich betreuten Laborpraktikums unterstützt.

2.) Bei der Untersuchung der Wirkung von Genistein auf die Regulation der Genexpression im infrarenalen Fettgewebe und in der Leber bei zwölf Monate alter ArKO-Mäusen hat mich *Claudia Arndt* im Rahmen eines vierwöchigen, durch mich betreuten Laborpraktikums unterstützt.

3.) Bei der Untersuchung der Wirkung von Genistein auf die Regulation der Genexpression im gonadalen Fettgewebe und in den Ovarien bei zwölf Monate alter ArKO-Mäusen hat mich *Christine Reitmayer* im Rahmen eines vierwöchigen, durch mich betreuten Laborpraktikums unterstützt.

4.) Bei der Untersuchung der Wirkung verschiedener östrogener Substanzen auf die Regulation der Genexpression in der Leber von ArKO-Mäusen nach einer 21-tägigen Behandlung hat mich *René Hauptstein* im Rahmen eines vierwöchigen, durch mich betreuten Laborpraktikums unterstützt.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen sowie materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

Danke

Mit ein paar Worten möchte ich mich bei einigen besonderen Menschen bedanken, die mich durch meine Doktorarbeit begleitet haben:

An erster Stelle möchte ich **Prof. Dr. Günter Vollmer** danken für die Überlassung des Themas, das große Vertrauen, welches er in mich gesetzt hat und für die unendliche Geduld, die er mit entgegengebracht hat.

Bedanken möchte ich mich bei **Dr. Jannette Wober**, meiner Supervisorin, für die viele Hilfe, die Denkanstöße (*auch die mit der Zaunlatte*) und den Beistand während dieser Arbeit.

Dr. Oliver Zierau danke ich für das Wecken neuer Interessen, das Mut machen „ich selbst zu bleiben“ sowie für das Wachsen der Liebe an der Arbeit mit Tieren.

Danke für die vielen Gespräche und dein offenes Ohr.

Dr. Georg Kretzschmar danke ich für die vielen wertvollen Tipps sowie das Mit- und Weiterdenken bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Dr. Frank J. Möller, Annekathrin M. Keiler und Anja Bliedtner danke ich für die guten und gehaltreichen Diskussionen, die mich immer ein Stück weiter gebracht haben. I have to say thank you to **Dr. Dena M.A. Amer** for correction of my English texts, I know it was not easy. **Sylvi Wolf** danke ich für den Blick über mein eigenes Forschungsgebiet hinaus, in der Tat es gibt auch noch etwas anderes als Östrogene und Fettgewebe.

Für die viele Hilfe im Tierstall möchte ich besonders *Frank* und *Anka* danken. *Anka* und **Dr. Anja Papke** danke ich für die Hilfe bei meinen kleinen, aber sehr vielen Sektionen.

Eure heitere und positive Art, der Tratsch, die Brezel und der Kaffee haben mir den Alltag versüßt.

Antje Beyer, Susanne Broschk und Manuela Rothe danke ich für die unglaublich vielen Hilfestellungen, die sichtbaren als auch die unsichtbaren.

Ebenso möchte ich **Katrin Richter** danken, die mir bei so manchen bürokratischen Fragestellungen und Problemen immer zur Seite stand.

Susann Ludwig, Christine Reitmayer, Claudia Arndt und René Hauptstein danke ich, dass sie es mir zugetraut haben ein guter Betreuer für ihr Praktikum zu sein und mir so nebenbei beim Erreichen meines Zieles sehr geholfen haben.

Mein Dank geht auch an all jenen aus dem Labor, die mich beim Weiterkommen dieser Arbeit unterstützten und die ich hier jetzt nicht alle namentlich erwähnen kann, stellvertretend sei **Lucas Schirmer** genannt.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieser Arbeit durch die Projekte Sta 861/2-1 und VO 410/10-2.

All meinen **Freunden** im besonderen **Antje, Sandra, Marcus** und **Thomas** danke ich für die Treue, die sie mir gehalten haben.

Nicht vergessen möchte ich **Katharina** und **Malte**, für dich eindeutig zu wenig Zeit hatte!

Mein besonderer Dank gilt jedoch meinen **Eltern**.

Mit ihrer grenzenlosen und uneingeschränkten Unterstützung haben sie mir oft den Weg durchs Leben geebnet. Sie waren immer für mich da und haben meine innere Ausgeglichenheit und Stärke aufgebaut und gefestigt, die ich während meines Studiums und dieser Dissertation benötigte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIV
Zusammenfassung	XVI
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Das Metabolische Syndrom	- 1 -
1.1.1 Adipositas.....	- 2 -
1.1.2 Fettgewebe.....	- 4 -
1.2 Das Hormonsystem	- 6 -
1.2.1 Steroidhormone	- 6 -
1.2.1.1 Biosynthese endogener Östrogene.....	- 7 -
1.2.1.2 Östrogensensitive Gewebe.....	- 9 -
1.2.2 Nukleäre Rezeptoren	- 10 -
1.2.2.1 Östrogenrezeptoren	- 11 -
1.2.2.1.1 Ligandenabhängige Aktivierung der Östrogenrezeptoren.....	- 13 -
Wirkmechanismus von E ₂ über das östrogenresponsive Element	- 13 -
Alternative Wege der E ₂ -Wirkmechanismen	- 14 -
Nicht-genomische Wege der E ₂ -Wirkmechanismen	- 16 -
1.2.2.1.2 Ligandenunabhängige Aktivierung der Östrogenrezeptoren	- 16 -
1.2.2.1.3 Koregulatoren.....	- 16 -
1.3 Östrogendefizienz	- 17 -
1.3.1 Menopause	- 18 -
1.3.1.1 Zusammenhang Metabolisches Syndrom und Menopause.....	- 19 -
1.3.2 Experimentelle Modelle für Östrogenprüfung.....	- 19 -
Uterotropher Assay	- 20 -
Aromatase-Mangel	- 20 -

1.4	Aromatase	- 21 -
1.4.1	Die Aromatase-knockout-Maus.....	- 22 -
1.5	Exogene Liganden der Östrogenrezeptoren	- 24 -
1.5.1	Phytoöstrogene	- 25 -
	Genistein	- 26 -
	8-Prenylnaringenin	- 27 -
1.5.2	Selektive-Östrogenrezeptor-Modulatoren.....	- 29 -
	Raloxifen.....	- 29 -
1.5.3	Das Antiöstrogen Fulvestrant	- 30 -
1.6	Überblick über die Gene, deren Expression untersucht wurde	- 31 -
1.6.1	Indikatoren für östrogene Responsivität	- 31 -
1.6.2	Ausgewählte Gene, die im Zusammenhang mit dem MetS unterschiedlich reguliert werden.....	- 32 -
1.6.3	Ausgewählte Gene, die eine Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen	- 35 -
1.7	Zielstellung der Arbeit.....	- 37 -
2.	Material.....	- 39 -
2.1	Verwendete Materialien, Laborgeräte und Lösungen	- 39 -
2.2	Verwendete Pufferlösungen und Reagenzien	- 41 -
3.	Methoden	- 42 -
3.1	Tierversuche	- 42 -
3.1.1	Vergleich der östrogenen Empfindlichkeit von Wildtyp- und ArKO- Mäusen (TV 1)	- 42 -
3.1.2	Vergleich der Wirksamkeit einer Östrogenbehandlung in Abhängigkeit des Lebensalters der ArKO-Mäuse (TV 2)	- 44 -
3.1.3	Vergleichende Untersuchung von E ₂ , Raloxifen und pflanzlichen Sekundärmetaboliten im uterotrophen Assay mit ArKO-Mäusen (TV 3)	- 45 -

3.1.4	Untersuchung von ArKO-Mäusen nach 21tägiger Behandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3)	46 -
3.2	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	48 -
3.2.1	Extraktion der Gesamt-RNA.....	48 -
3.2.1.1	Extraktion der Gesamt-RNA mittels phenolischer Trennung.....	48 -
3.2.1.2	Extraktion der Gesamt-RNA mittels Guanidin-Isothiocyanat-Lyse	49 -
3.2.2	Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität der gelösten Gesamt-RNA.....	49 -
3.2.3	DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen	49 -
3.2.4	Synthese der cDNA.....	50 -
3.3	qPCR-quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion.....	52 -
3.3.1	Primer-Design.....	52 -
3.3.2	Optimierung der PCR-Bedingungen	54 -
3.3.3	Bestimmung der PCR – Effizienz.....	55 -
3.3.4	Die quantitative real-time-PCR.....	56 -
	Schmelzkurvenanalyse	57 -
3.3.5	Auswertung der quantitativen real-time PCR	58 -
3.4	Biochemische Parameter	59 -
3.4.1	Serumleptin-Spiegel	59 -
3.4.2	Plasmaglukose-Spiegel	60 -
3.5	Statistische Auswertung	60 -
4.	Ergebnisse	62 -
4.1	Vergleich der E ₂ -Responsivität von WT- und ArKO-Mäusen mit Bezug zum MetS und menopausalen Symptomen (TV 1).....	62 -
4.1.1	Vergleichende funktionelle Prüfung in einem genetischen und einem chirurgischen Modell der Östrogendefizienz	63 -
4.1.1.1	Einfluss der Östrogendefizienz auf das Körpergewicht.....	63 -
4.1.1.2	Einfluss der Östrogendefizienz auf das Uterusfeuchtgewicht	64 -

4.1.1.3	Einfluss der Östrogendefizienz auf den Serumleptin-Spiegel.....	65 -
4.1.1.4	Einfluss der Östrogendefizienz auf den Plasmaglukose-Spiegel.....	66 -
4.1.2	Einfluss der Östrogendefizienz auf die Genexpression	66 -
4.1.2.1	Uterus	67 -
4.1.2.2	Gonadales Fettgewebe.....	71 -
4.2	Einfluss des Lebensalters auf die östrogene Responsivität (TV 2).....	75 -
4.2.1	Einfluss des Alters auf physiologische und biochemische Parameter in der ArKO-Maus	75 -
4.2.1.1	Einfluss des Alters auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen.....	75 -
4.2.1.2	Einfluss des Alters auf die Östradiolempfindlichkeit im Uterus von ArKO-Mäusen	76 -
4.2.1.3	Einfluss des Alters auf das Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen mit und ohne Östradiolbehandlung	77 -
4.2.1.4	Einfluss des Alters auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen	78 -
4.2.1.5	Einfluss des Alters auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen.....	79 -
4.2.2	Einfluss des Lebensalters auf die Genexpression	79 -
4.2.2.1	Uterus	79 -
4.2.2.2	Gonadales Fettgewebe.....	85 -
4.2.2.3	Infrarenales Fettgewebe	89 -
4.3	Prüfung der östrogenen Wirksamkeit nach einer Kurzzeitbehandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3).....	94 -
4.3.1	Physiologische und biochemische Parameter nach dreitägiger Behandlung mit östrogenähnlichen Substanzen	94 -
4.3.1.1	Einfluss der Behandlung auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen.....	95 -
4.3.1.2	Einfluss der Behandlung auf das Uterusfeuchtgewicht von ArKO-Mäusen..	95 -
4.3.1.3	Einfluss der Behandlung auf das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen	96 -
4.3.1.4	Einfluss der Behandlung auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen ...	97 -

4.3.1.5	Einfluss der Behandlung auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen	- 98 -
4.3.2	Einfluss der dreitägigen Behandlung auf die Genexpression der ArKO-Maus	- 98 -
4.3.2.1	Uterus.....	- 98 -
4.3.2.2	Gonadales Fettgewebe	- 101 -
4.3.2.3	Infrarenales Fettgewebe.....	- 105 -
4.4	Prüfung der östrogenen Wirksamkeit nach einer Langzeitbehandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 4)	- 108 -
4.4.1	Einfluss der Langzeitexposition auf physiologische und biochemische Parameter	- 109 -
4.4.1.1	Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen.....	- 109 -
4.4.1.2	Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Uterusfeuchtgewicht von ArKO-Mäusen	- 110 -
4.4.1.3	Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen.....	- 111 -
4.4.1.4	Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen.....	- 112 -
4.4.1.5	Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen	- 112 -
4.4.2	Einfluss einer langfristigen Behandlung auf die Genexpression der ArKO-Maus	- 113 -
4.4.2.1	Uterus.....	- 113 -
4.4.2.2	Gonadales Fettgewebe	- 115 -
4.4.2.3	Infrarenales Fettgewebe.....	- 118 -
5.	Diskussion	- 123 -

5.1	Vergleichende Evaluierung chirurgisch und genetisch bedingter Östrogendefizienz (TV 1 und TV 2)	- 124 -
5.1.1	Uterus	- 125 -
5.1.2	Fettgewebe	- 130 -
5.1.3	Einfluss des Lebensalters auf die Organphysiologie.....	- 134 -
5.1.4	Resümee der tierexperimentellen Studien TV 1 und TV 2	- 134 -
5.2	Evaluierung der Beobachtungen in den Kurz- und Langzeitbehandlungen mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3 und TV 4).....	- 136 -
5.2.1	Uterus	- 137 -
5.2.2	Fettgewebe	- 144 -
5.2.3	Biochemische Marker	- 153 -
5.2.4	Fazit.....	- 154 -
6.	Schlussfolgerung und Ausblick	- 155 -
7.	Literaturverzeichnis	- 157 -
8.	Anhang.....	- 183 -
8.1	infrarenales Fettgewebe TV 1	- 183 -
8.2	Leber TV 1.....	- 184 -
8.3	Leber TV 2	- 184 -
8.4	Leber TV 3	- 185 -
8.5	Leber TV 4	- 187 -

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AF1-2	Aktivierungsfunktion 1-2
ArKO	Aromatase knockout
BW	Body weight / Körpergewicht
cDNA	complementary DNA
<i>Clu</i>	Clusterin
CO ₂	Kohlendioxid
DBD	DNA-Bindedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E ₂	17β-Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERE	Östrogenresponsives Element
ERα	Östrogenrezeptor alpha
<i>Esr1</i>	Östrogenrezeptor alpha, (Gen)
ERβ	Östrogenrezeptor beta
<i>Esr2</i>	Östrogenrezeptor beta, (Gen)
Ful	Fluvestrant, (ICI 182 780)
Gen	Genistein
IL-6	Interleukin-6
<i>Il6</i>	Interleukin-6 (Gen)
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
<i>Il6ra</i>	Interleukin-6 Rezeptor (Gen)
infr. AT WW	Feuchtgewicht des infrarenale Fettgewebes
INSIG1	<i>insulin-induced gene 1</i>
INSIG2	<i>insulin-induced gene 2</i>

Abkürzung	Bedeutung
<i>Insig1</i>	<i>insulin-induced gene 1</i> (Gen)
<i>Insig2</i>	<i>insulin-induced gene 2</i> (Gen)
<i>Insr</i>	Insulin Rezeptor (Gen)
KHK	koronare Herzerkrankung
LBD	Ligandenbindedomäne
<i>Lep</i>	Leptin (Gen)
<i>Lepr</i>	Leptin Rezeptor (Gen)
<i>Lft</i>	Lactoferrin (Gen)
LH	Luteinisierendes Hormon
Lösungsmittel	Rizinusöl, versetzt mit DMSO
MetS	Metabolisches Syndrom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMVL	Moloney Murine leukämie Virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ovx	ovariectomiert / Ovariectomie
<i>Pgr</i>	Porgesteron Rezeptor (Gen)
PPAR γ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
Pparg	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (Gen)
PPRE	<i>PPAR response element</i>
Ral	Raloxifen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
SERM	selektiver Östrogenrezeptor Modulator
SREPP	Sterol regulatory element-binding protein
<i>Srebp</i>	Sterol regulatory element-binding protein (Gen)

Abkürzung	Bedeutung
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
T _m	Schmelztemperatur
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
<i>Tnfa</i>	Tumor-Nekrose-Faktor alpha (Gen)
UWW	Uterusfeuchtgewicht
vt	<i>vehicle treated</i> , kontrollbehandelt
WT	Wildtyp
α ERKO	Östrogenrezeptor alpha Knock-Out
β ERKO	Östrogenrezeptor beta Knock-Out
8-PN	8-Prenylnaringenin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1	Vereinfachte Darstellung der Interaktionen zwischen Komponenten des Metabolischen Syndroms.....	- 2 -
Abb. 1. 2	Vereinfachte Darstellung der Fettverteilung im Körper.....	- 3 -
Abb. 1. 3	Vereinfachte Darstellung von Faktoren, die im Fettgewebe produziert und sezerniert werden	- 5 -
Abb. 1. 4	Strukturformel Östron (E_1) und Östradiol (E_2)	- 7 -
Abb. 1. 5	Vereinfachte Darstellung der Hauptwege der Steroidbiosynthese.....	- 8 -
Abb. 1. 6	Aufbau und funktionelle Domänen der humanen Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$	- 11 -
Abb. 1. 7	Metabolische Effekte von $ER\alpha$ und $ER\beta$ im weiblichen Organismus.....	- 12 -
Abb. 1. 8	Klassische Wirkmechanismus von E_2 über das ERE	- 14 -
Abb. 1. 9	Alternative genomische Wirkmechanismen von E_2 über AP-1 bzw. Sp-1.....	- 14 -
Abb. 1. 10	NF κ B-Inhibierung durch E_2	- 15 -
Abb. 1. 11	Verlauf der Menopause	- 18 -
Abb. 1. 12	Aromatase-Gen (Cyp19).....	- 21 -
Abb. 1. 13	Physiologische Regulation der Aromatase Expression.....	- 22 -
Abb. 1. 14	Aromatase knockout (ArKO)-Maus im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Maus.....	- 23 -
Abb. 1. 15	Einteilung von Östrogenen	- 25 -
Abb. 1. 16	Strukturformel von Genistein	- 27 -
Abb. 1. 17	Strukturformel von 8-PN	- 28 -
Abb. 1. 18	Strukturformel von Raloxifen.....	- 30 -
Abb. 1. 19	Strukturformel von Fulvestrant.....	- 30 -
Abb. 1. 20	vereinfachte Darstellung der Interaktion Insulin Rezeptors und GLUT4.....	- 34 -
Abb. 1. 21	SREBP Zyklus der Cholesterin-Regulation	- 35 -
Abb. 3. 1	ArKO-Maus nach Pellet-Implantation.....	- 47 -
Abb. 4. 1	Körpergewicht (BW)	- 64 -
Abb. 4. 2	Uterusfeuchtgewicht (UWW).....	- 65 -

Abb. 4. 3	Serumleptin-Konzentration in pg/mL.....	- 66 -
Abb. 4. 4	Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus	- 68 -
Abb. 4. 5	Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus.....	- 69 -
Abb. 4. 6	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus.....	- 70 -
Abb. 4. 7	Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe.....	- 72 -
Abb. 4. 8	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe	- 73 -
Abb. 4. 9	Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe.....	- 74 -
Abb. 4. 10	Körpergewicht (BW)	- 76 -
Abb. 4. 11	Uterusfeuchtgewicht (UWW)	- 77 -
Abb. 4. 12	Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (infr. AT WW).....	- 78 -
Abb. 4. 13	Serumleptin-Konzentration in pg/mL.....	- 78 -
Abb. 4. 14	Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus	- 80 -
Abb. 4. 15	Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus.....	- 82 -
Abb. 4. 16	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus.....	- 84 -
Abb. 4. 17	Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe.....	- 85 -
Abb. 4. 18	Expression der Gene mit Verbindung zur Pathogenese des MetS im gonadalen Fettgewebe.....	- 87 -
Abb. 4. 19	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe	- 88 -
Abb. 4. 20	Expression der Östrogenrezeptoren im infrarenalen Fettgewebe	- 90 -
Abb. 4. 21	Expression der Gene mit Verbindung zur Pathogenese des MetS im infrarenalen Fettgewebe	- 91 -
Abb. 4. 22	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe.....	- 93 -
Abb. 4. 23	Körpergewicht (BW)	- 95 -
Abb. 4. 24	Uterusfeuchtgewicht (UWW)	- 96 -

Abb. 4. 25	Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (iAT WW)	- 97 -
Abb. 4. 26	Serumleptin – Konzentration in pg/mL.....	- 97 -
Abb. 4. 27	Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus.....	- 99 -
Abb. 4. 28	Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus	- 99 -
Abb. 4. 29	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus	- 100 -
Abb. 4. 30	Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe	- 102 -
Abb. 4. 31	Expression des Clu im gonadalen Fettgewebe.....	- 102 -
Abb. 4. 32	Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe	- 103 -
Abb. 4. 33	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe.....	- 104 -
Abb. 4. 34	Expression der Östrogenrezeptoren im infrarenalen Fettgewebe	- 105 -
Abb. 4. 35	Indikator der Östrogenresponsivität im infrarenalen Fettgewebe.....	- 106 -
Abb. 4. 36	Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind im, infrarenalen Fettgewebe	- 107 -
Abb. 4. 37	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe	- 108 -
Abb. 4. 38	Körpergewicht (BW)	- 110 -
Abb. 4. 39	Uterusfeuchtgewicht (UWW)	- 110 -
Abb. 4. 40	Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (infr. AT WW).....	- 111 -
Abb. 4. 41	Serumleptin Konzentration in pg/mL	- 112 -
Abb. 4. 42	Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus.....	- 113 -
Abb. 4. 43	Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus	- 114 -
Abb. 4. 44	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus	- 115 -
Abb. 4. 45	Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe	- 117 -
Abb. 4. 46	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe.....	- 118 -

Abb. 4. 47	Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im infrarenalen Fettgewebe.....	- 120 -
Abb. 4. 48	Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe	- 121 -
Abb. 5. 1	hypothetischer Mechanismus des Einflusses östrogenähnlicher Substanzen im Uterus von ArKO-Mäusen	- 144 -
Abb. 8. 1	Gene, die mit dem MetS verbunden sind in der Leber	- 186 -
Abb. 8. 2	Gene, die einen Link zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen im	- 187 -
Abb. 8. 3	Gene, die mit dem MetS verbunden sind in der Leber	- 188 -
Abb. 8. 4	Gene, die eine Verlinkung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen in der Leber	- 189 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. 1	Östrogensensitive Gewebe	- 10 -
Tab. 1. 2	Relative Bindungsaffinität östrogenwirksamer Substanzen in %	- 26 -
Tab. 1. 3	Östrogenresponsive Gene, die mittels real-time-PCR untersucht wurden	- 32 -
Tab. 1. 4	Gene mit Bezug zum MetS, die mittels real-time-PCR untersucht wurden	- 33 -
Tab. 1. 5	Gene, die eine Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen, die mittels real-time -PCR untersucht wurden	- 36 -
Tab. 2. 1	Behandlungssubstanzen	- 39 -
Tab. 2. 2	Enzyme und Chemikalien für PCR.....	- 39 -
Tab. 2. 3	Chemikalien	- 40 -
Tab. 2. 4	Extraktions- und Analyse-Kits	- 40 -
Tab. 2. 5	Einweg-Material	- 40 -
Tab. 2. 6	Geräte	- 41 -
Tab. 2. 7	10x PCR-Puffer nach Manatis (170).....	- 41 -
Tab. 3. 1	Behandlungsschema für TV 1	- 43 -
Tab. 3. 2	Behandlungsschema für TV 2	- 44 -
Tab. 3. 3	Behandlungsschema für TV3.....	- 45 -
Tab. 3. 4	Verwendete Substanzen sowie deren Dosierungen	- 46 -
Tab. 3. 5	Behandlungsschema für TV 4.....	- 47 -
Tab. 3. 6	Zusammensetzung eines DNase -Verdau nach Maniatis (170).....	- 50 -
Tab. 3. 7	Zusammensetzung und Ablauf eines für die cDNA-Synthese Ansatzes	- 51 -
Tab. 3. 8	Parameter des Primerdesign mittels Primer3 (177).....	- 52 -
Tab. 3. 9	verwendete Primer für die qPCR, einschließlich der Amplikongröße.....	- 53 -
Tab. 3. 10	Matrix zur Primeroptimierung.....	- 54 -
Tab. 3. 11	verwendete Volumina für MgCl ₂ und Primer	- 55 -
Tab. 3. 12	Pipettierschema eines qPCR-Ansatzes	- 56 -
Tab. 3. 13	PCR-Verlauf.....	- 57 -

Tab. 4. 1	Genexpressionen im infrarenalen Fettgewebe	- 119 -
Tab. 8. 1	Vergleich der Basiswerte ($2^{-\Delta ct}$ Werte) im infrarenale Fettgewebe zwischen den ovx WT-Mäusen und den vt ArKO.	- 183 -
Tab. 8. 2	Vergleich der Genexpressionen im infrarenalen Fettgewebe zwischen den vt WT Mäusen und den ArKO E ₂ Mäusen.	- 183 -
Tab. 8. 3	Genexpressionen in der Leber	- 186 -

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden die westlichen Industrienationen vermehrt mit Wohlstandserkrankungen konfrontiert, welche durch Überernährung und gleichzeitigem Bewegungsmangel hervorgerufen werden. Dabei gilt es besonders die Fettsucht und das meist damit vergesellschaftete Metabolische Syndrom (MetS) zu nennen. Bei dem MetS handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die laut „*International Diabetes Foundation*“ (IDF) unter anderem durch erhöhte Triglyceride, ein niedrigeres HDL-Cholesterin, einen erhöhten Blutdruck und einen pathologischen Nüchternblutzucker gekennzeichnet ist.

Eine wichtige Subpopulation von Betroffenen des MetS sind Frauen in den Wechseljahren, von denen ca. 40 % Symptome des MetS zeigen. In Studien zeigte sich, dass die Hormonersatztherapie (HRT) Parameter des Stoffwechsels in postmenopausalen Frauen unterschiedlich beeinflusst, je nachdem, ob sie gleichzeitig Symptome des MetS zeigen oder nicht. So werden z. B. Probleme der Insulinresistenz durch HRT von postmenopausalen Frauen zwar prinzipiell verbessert, aber nur, wenn diese Frauen nicht gleichzeitig weitere Symptome des MetS aufweisen wie z. B. Adipositas. Um sowohl die Folgen für die Gesundheit des betroffenen Individuums zu minimieren als auch die sozioökonomischen Folgen in Schranken halten zu können, sollten präventive Behandlungsmaßnahmen den kurativen deutlich zu bevorzugen sein. Voraussetzung für eine effektive chemische Prävention des MetS und seiner Folgen für die Gesundheit ist die genaue Kenntnis der molekularen Grundlagen der pathophysiologischen Veränderungen, die als Folge der Östrogendefizienz zur verstärkten Ausprägung der Symptome des MetS bzw. der Adipositas führen. Ein erster plausibler mechanistischer Ansatzpunkt schien dabei durch das Wechselspiel von Östrogenen und Leptin gegeben zu sein. So ist z. B. der Leptin-Spiegel in Frauen gegenüber Männern dreifach höher. Ein „cross-talk“ zwischen den beiden Hormonen im Hypothalamus gilt als nachgewiesen.

Die Aromatase-knockout (ArKO)-Maus ist ein Mausmodell, das als Phänotyp die Östrogendefizienz mit den Symptomen des MetS vergesellschaftet. Durch die Deletion des Cyp19-Gens (Aromatase-Gen) sind diese Tiere nicht in der Lage, Östrogene zu synthetisieren. Dies äußert sich phänotypisch durch eine Infertilität beider Geschlechter

und im zunehmenden Lebensalter durch die Ausprägung einer exzessiven Adipositas. Durch diese Eigenschaft scheint die ArKO-Maus ein adäquates Modell zur Erforschung von Folgen der Östrogendefizienz einschließlich des MetS zu sein.

Aus diesem Grund war es interessant zu prüfen, ob und in welchem Umfang die ArKO-Maus a) ein adäquates Modell für hormonelle Prüfungen bei Zuständen der Östrogendefizienz im Allgemeinen und b) im Zusammenhang mit der Östrogendefizienz vergesellschaftete Fettsucht darstellt.

Symptome der Wechseljahre sind ein Problem des alternden Organismus. Diese Tatsache wird in vielen tierexperimentellen Studien zu Erscheinungen der Östrogendefizienz nicht berücksichtigt. Deshalb war es weiterhin interessant, den Einfluss des Alters zu Beginn der Behandlung der ArKO-Maus zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Prüfung östrogenähnlicher Substanzen im ArKO-Mausmodell. Hier war es zusätzlich von Interesse neben dem Einfluss der östrogenen Substanzen auf ausgewählte Gewebe in der ArKO-Maus auch die Bedeutung der Behandlungsdauer zu untersuchen. Zur Beantwortung der ersten Frage die östrogene Empfindlichkeit betreffend wurden ArKO-Mäuse mit der ihren Wildtyp (WT)-Wurfgeschwister verglichen. Dabei wurden jeweils die östrogendefizienten Tiere, ArKO-Maus und ovariectomierte (ovx) WT-Maus, sowie die unter Östrogeneinfluss stehenden Tiere, E₂-supplementierten ArKO-Mäuse und intakte WT-Mäuse miteinander verglichen. Basierend auf den physiologisch, biochemisch und molekularbiologisch erhobenen Daten ist das Fazit der ersten tierexperimentellen Studie: Die ArKO-Maus scheint anders als die ovx WT-Maus kein adäquates experimentelles Modell für reine Östrogenprüfungen zu sein. Sie scheint aber geeignet für molekulare Untersuchungen im Zusammenhang von Östrogendefizienz und MetS zu sein. Zwischen den beiden Mausmodellen ArKO und WT fand sich auf physiologischer und molekularer Ebene eine Vielzahl von Unterschieden. Die ArKO-Mäuse waren signifikant schwerer und auch der Verfettungsgrad war bei den ArKO-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den ovx WT-Mäusen. Bei der Regulation Genexpression durch Östrogene zeigte ein Teil der untersuchten Gene sogar ein entgegengesetztes Expressionsmuster.

Zur Untersuchung, inwiefern das Lebensalter Einfluss auf physiologische und molekulare Eigenschaften der Östrogenwirkung nimmt, wurden weibliche ArKO-Mäuse aus zwei unterschiedlichen Altersgruppen untersucht. Mit der zweiten tierexperimentellen Studie konnte eine Reihe von Parametern identifiziert werden, die in ihrer östrogenen Regulation eine Abhängigkeit vom Alter aufweisen. So unterscheidet sich die Regulation des Körpergewichts signifikant zwischen beiden Altersgruppen, ebenso wie die des Uterusfeuchtgewichts. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass diese sich altersabhängig verändert und zum Teil im Vergleich der beiden untersuchten Lebensalter sogar entgegengesetzte Muster der östrogenabhängigen Regulation der Genexpression ausbildeten. Als Resümee der zweiten Studie kann daher festgehalten werden, dass bei den ArKO-Mäusen das Lebensalter der Tiere eine entscheidende Determinante für die Östrogensensitivität ist. Dies scheint insofern wichtig, wenn die Endpunkte auf Ebene von Geweben und Genen betrachtet werden, die besonders dem Alterungsprozess unterliegen bzw. die für gealterte Populationen relevant sind.

Bei der HRT wird oft die Verwendung von Phytoöstrogenen als sichere „Alternativtherapie“ propagiert. Um zu überprüfen welche Effekte E_2 , Raloxifen und pflanzliche Sekundärmetaboliten auf physiologische Parameter und die Regulation der Expression ausgewählter Gene in relevanten Zielgeweben der ArKO-Mäuse haben, wurde eine Tiergruppe für drei Tage und eine andere Tiergruppe für 21 Tage mit Raloxifen, Genistein und 8-Prenylnaringenin behandelt. Raloxifen ist eine in der HRT verwendete synthetisch hergestellte östrogene Substanz, die ein bekannter Selektiver-Östrogenrezeptor-Modulator (SERM) ist. Das Soja-Isoflavonoid Genistein und das im Hopfen vorkommende Flavanon 8-Prenylnaringenin (8-PN) sind dagegen natürlich vorkommende sekundäre Pflanzenmetabolite. In den durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es zu einer Verringerung des Fettgewebes durch alle östrogene Substanzen kam. Für die Regulation der Expression östrogenen Zielgene kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sich nach einer 21-tägigen Behandlungszeit ein anderes Muster der Regulation der Genexpressionsmuster im Uterus ergab als nach einer dreitägigen Behandlung. Dies bestätigt die Annahme, dass auch die Dauer der Behandlung einen großen Einfluss auf die Genexpression und die dadurch vermittelten

Veränderungen der Physiologie und des Stoffwechsels hat. Weiter konnte belegt werden, dass Raloxifen, Genistein und 8-PN auf den Uterus und die beiden Fettgewebe ähnliche Effekte zeigten wie E_2 . In der Expression der untersuchten Gene konnte dies allerdings nicht so deutlich nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd kann anhand dieser Studien festgehalten werden, dass die ArKO-Maus kein adäquater Ersatz der ovx WT-Maus zur hormonellen Prüfung östrogenen Substanzen ist. Sie scheint aber ein geeignetes, ergänzendes experimentelles Modell für Fragestellungen zu sein, die sich mit Untersuchungen der Zusammenhänge von Östrogenmangel und MetS beschäftigen. Ebenso zeigten die Daten, dass das Lebensalter zu Beginn des Experiments eine entscheidende Determinante für die Qualität der östrogenen Wirkung ist. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verwendeten östrogenen Substanzen keine eindeutigen SERM-Eigenschaften, sondern eher östrogenen Wirkeigenschaften in den ArKO-Mäusen aufweisen.

1. Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom

Gemäß der Definition des medizinischen Wörterbuches von Zetkin-Schaldach (2009) wird ein Syndrom definiert als ein „*Symptomenkomplex, welches Muster multipler Symptome mit einheitlicher, aber unbekannter formaler Pathogenese aufweist*“ (1). Damit passt das Metabolische Syndrom (MetS), welches auch als tödliches Quartett, „Syndrom X“ oder „Reaven-Syndrom“ bezeichnet wird, in die Definition eines Syndroms. Eine einheitlich gültige Definition für das MetS gibt es bis heute allerdings nicht. Bereits aufgestellte Definitionen wurden in den letzten Jahren mehrfach geändert. Die Klassifikationen orientieren sich entweder an der Insulinresistenz (Insulinresistenzsyndrom, WHO-Klassifikation 1999) (2) oder dem Lebensstil. Die am häufigsten angewandte Definition ist die der *International Diabetes Federation* (IDF) (3). Durch die IDF wird das MetS unter anderem mit dem Vorhandensein einer abdominellen Adipositas definiert. Ein Übergewicht erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten (4). Das Risiko, ein MetS zu entwickeln, steigt weiterhin, wenn *Diabetes mellitus* als ein zusätzlicher Komplikationsfaktor auftritt. Eine vermehrte Sekretion von z. B. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) führt zu einer Insulinresistenz (5). Die Sekretion der beiden Zytokine ist dann erhöht, wenn die Fettdepots ebenfalls erhöht sind. Die so eintretende Insulinresistenz kann zur Entstehung von *Diabetes mellitus* Typ 2 beitragen. Von *Diabetes mellitus* spricht man, wenn der Nüchternblutzuckerwert den Normalwert auf Dauer über 30 % überschreitet. Weitere metabolische Störungen, die für ein MetS sprechen, sind Fettstoffwechselstörungen, wenn dadurch die Triglyceride LDL und VLDL in erhöhter Konzentration und HDL in verringerter Konzentration vorliegen sowie der Blutdruck erhöht ist. In diesem Zusammenhang besteht auch eine deutlich höhere Inzidenz gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen (6) (Abb. 1.1). Bereits 1988 deuteten Reaven et al. an, dass Insulinresistenz ein Grund für das MetS ist, aber nicht ausschließlich bei übergewichtigen Menschen mit *Diabetes mellitus* Typ II vorkommt, sondern auch bei nicht adipösen Menschen (7).

Die nachfolgende Frage konnte bisher allerdings nicht vollständig geklärt werden und bietet die Grundlage für eine immer wieder aufflammende Debatte:

Sind Adipositas und Insulinresistenz Ursache für das MetS oder sind sie die Konsequenz einer tiefgreifenden metabolischen Veränderung?

Das MetS hat sich in den letzten Jahren nicht nur in der westlichen Gesellschaft als multifaktorielle Krankheit manifestiert (8,9), sondern ist mittlerweile auch in Asien auf dem Vormarsch (10–12).

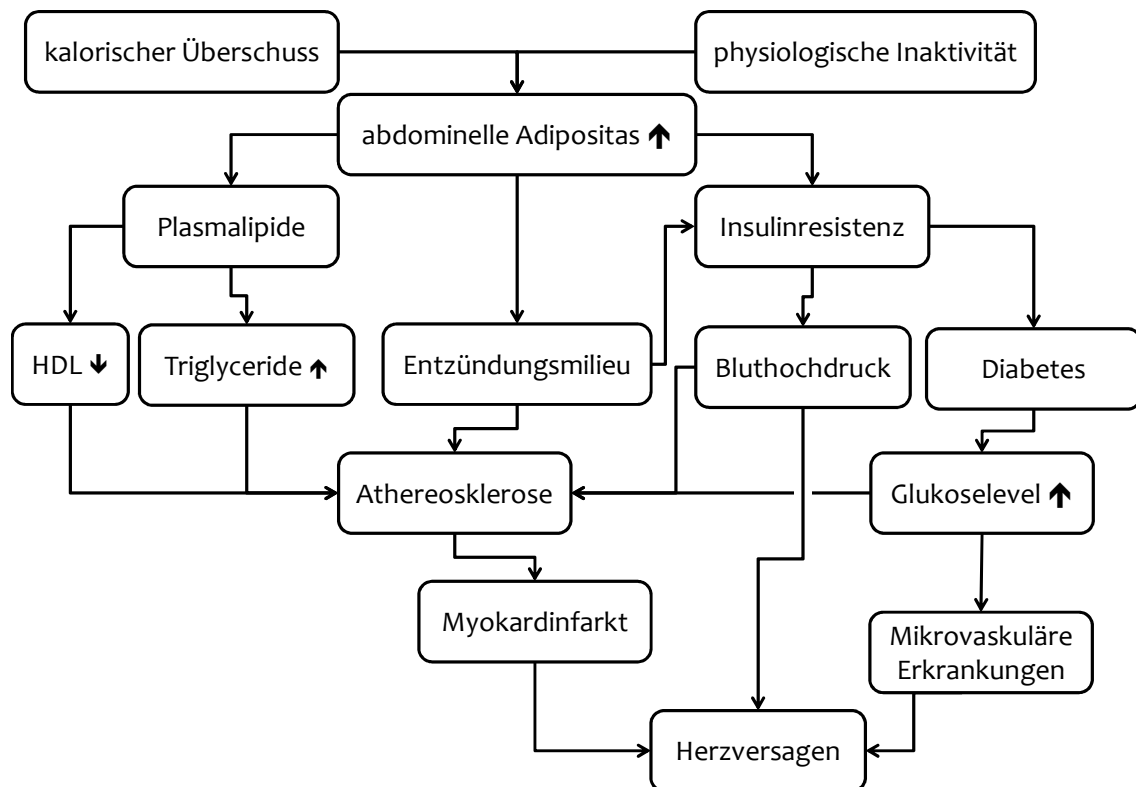


Abb. 1.1 Vereinfachte Darstellung der Interaktionen zwischen Komponenten des Metabolischen Syndroms

Bisher galt Adipositas in Asien eher als seltene Erkrankung, dies hat sich, auch bedingt durch den Ernährungswandel, stark verändert. Bedingt durch die hormonellen Veränderungen gehören postmenopausale Frauen ebenfalls zur Risikogruppe derer, die ein MetS ausprägen können (Kapitel 1.3.1.1).

1.1.1 Adipositas

Die Inzidenz von Adipositas und adipositasverwandten Ko-Erkrankungen ist in den letzten Jahren dramatisch gestiegen. Im Wesentlichen ist Adipositas ein Resultat von exzessivem

Energiekonsum und zu geringem Energieverbrauch, also einer nicht ausbalancierten Energiehomöostase (Abb. 1.1). Erhöhter Genuss von Fetten und Zucker und das Fehlen von Bewegung sind mit Fettleibigkeit verknüpft (13).

Mit Hilfe klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Fettverteilungsmuster das Risiko für die Entwicklung eines MetS besser beschreibt als die Gesamtkörperfettmasse. So besteht eine Korrelation zwischen viszeraler Fettmasse und Insulinresistenz sowie MetS und Risiko für koronare Herzerkrankung (KHK) (14–17). Abhängig von der Fettgewebelokalisation konnten Unterschiede in der Insulinsensitivität, der lipolytischen Aktivität, dem Glukosestoffwechsel und der endokrinen Regulation dargestellt werden (18).

„Not all fat is created equal“ könnte laut Ferries et al. die neue Lehrmeinung der Adipositasforschung sein (19). So kommt es nicht nur auf die Menge des Fettes an, sondern auch auf dessen Verteilung. Unterschieden wird daher in periphere (gynoid) und abdominelle (androide) Adipositas (Abb. 1.2).

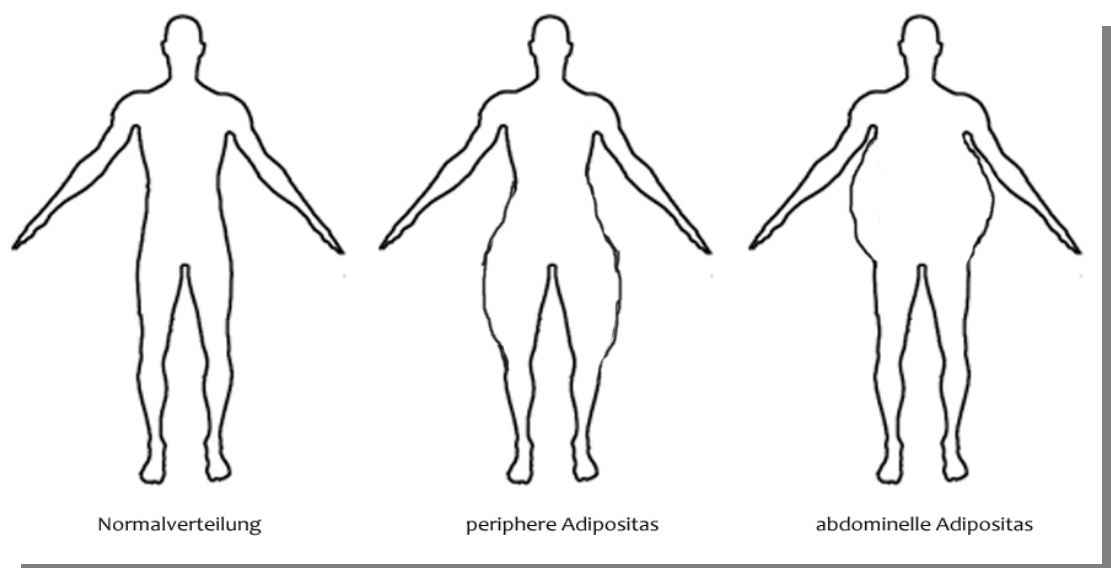


Abb. 1. 2 Vereinfachte Darstellung der Fettverteilung im Körper

Die abdominelle Adipositas gilt als die mit dem höheren Risiko für KHK und somit auch für die Entstehung eines MetS. Bei dieser Form der Adipositas führt die exzessive Fettakkumulation zu einer Sekretion von freien Fettsäuren in der *Vena porta*, was zu einer

hepatischen Insulinresistenz, einem Hauptcharakteristikum des *Diabetes mellitus* Typ 2 , führt und eine aberrante Akkumulation von Fetten in den Hepatozyten, was eine Fettleber nach sich zieht (20,21).

Die klinische Bedeutung einer differenzierten Charakterisierung der abdominal-betonten Adipositas besteht darin, Risikogruppen des MetS aufgrund molekularer und genetischer Marker zu definieren und daraus Strategien zur Differenzialtherapie der Adipositas abzuleiten (18).

1.1.2 Fettgewebe

Das Fettgewebe ist eine Form des Bindegewebes, welches an verschiedenen Stellen des Körpers verteilt ist. Es ist aus Adipozyten aufgebaut, deren grundsätzliche Aufgabe es ist, Fett zu synthetisieren (Lipogenese) und zu speichern. Fettgewebe ist aber nicht gleich Fettgewebe. Daher unterscheidet man zwischen sogenanntem Speicherfett und Baufett. Ein klassisches Beispiel für Speicherfett ist das subkutane Fettgewebe, es liegt direkt unter der Haut und gilt als ein wichtiger Wärmeisolator des Körpers. Baufett hingegen dient der Erhaltung der Organlage wie das infrarenale Fettgewebe bei den Nieren. Frauen neigen generell dazu mehr subkutanes Fett zu akkumulieren, während Männer eher viszerales Fett akkumulieren.

Das Fettgewebe ist mehr als ein Speicherorgan für Fett. Mittlerweile zählt man es zu einem der größeren endokrinen Organe des Körpers (19,22,23). Es produziert verschiedene Hormone, die den Stoffwechsel im Körper regulieren (Abb. 1.3).

Viele der in den Fettzellen gebildeten Substanzen, besonders jene des abdominellen Fettgewebes, sind mit dem Auftreten von metabolischen sowie kardiovaskulären Komplikationen der Adipositas verknüpft. So wurde 1994 zuerst Leptin als ein Produkt des *ob*-Gens identifiziert (24). Es wird fast ausschließlich im Fettgewebe exprimiert und ist in seiner Sekretion abhängig vom Fettzellvolumen. Leptin spielt eine wichtige Rolle bei der hypothalamischen Regulierung des Körpergewichts (25). In abdominellen Adipozyten werden die pro-inflammatorischen Marker wie dem TNF α und IL-6 stärker sezerniert, verglichen zum subkutanen Fettgewebe. Ein erhöhtes Serum-IL-6 steht in der Diskussion eine pathogenetische Rolle beim MetS zu spielen (26). Durch das IL-6 wird die

Insulinresistenz negativ beeinflusst, da proatherogene wie auch prodiabetische Effekte ausgelöst werden. Mit dem TNF α wird ein parakriner Regulator im Fettgewebe sezerniert, der die Insulinsensibilität in den Adipozyten reduziert und dadurch teilweise die Produktion von freien Fettsäuren erhöht (27). Es wird bisher nur vermutet, dass die Adipozyten es selbst sind, die diese Marker produzieren und zwar durch die ebenfalls im adipösen Gewebe erhöhte Konzentration von Makrophagen (28). Ein weiteres Protein, welches ausschließlich in reifen Fettzellen synthetisiert wird, ist das Adiponektin. Es wird mit dem Ansteigen einer Insulinsensitivität assoziiert (29). Daneben schreibt man ihm auch antiarteriosklerotische Eigenschaften zu (30).

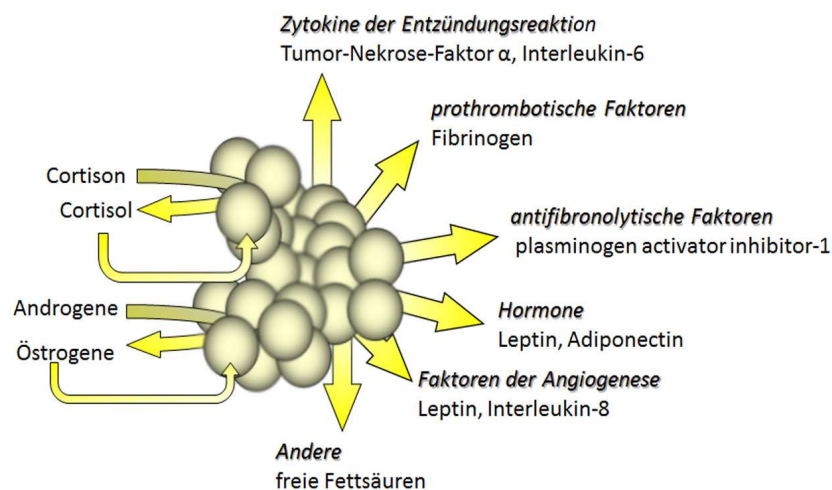


Abb. 1. 3 Vereinfachte Darstellung von Faktoren, die im Fettgewebe produziert und sezerniert werden
modifiziert nach (31)

Das Fettgewebe unterliegt einer steten Dynamik (32,33). Die Anzahl der Adipozyten bleibt etwa ab dem 20. Lebensjahr konstant (32), lediglich das Zellvolumen passt sich später dem Metabolismus an (33). Auch wenn die Anzahl der Adipozyten im adulten Organismus sich kaum verändert, erneuern sich dennoch die Zellen selbst in gewissen Abständen (32). Adipositas ist charakterisiert durch einen Überschuss an Fettgewebe. Eingebunden in die Entwicklung einer Insulinresistenz bei Fettleibigkeit ist das Resistin, in dem es in die insulinvermittelte zelluläre Glukoseaufnahme eingreift (34). Auch sorgt Resistin für eine Hemmung der Adipozytendifferenzierung (35).

Neben der Nebenniere ist das Fettgewebe der größte Freisetzungsort für Steroidhormone im Körper. Dabei werden in der Nebennierenrinde unter anderem die Androgene Dehydroepiandrosteron und Androstendion synthetisiert und freigesetzt. Diese können wiederum im Fettgewebe mit Hilfe von Aromatase zu Östradiol umgewandelt werden (Abb. 1.5). Das Fettgewebe stellt daher die wichtigste Quelle für Östrogen in postmenopausalen Frauen dar (Kapitel 1.2.1.2).

1.2 Das Hormonsystem

Zur Koordination der Funktionen aller Körperzellen stehen dem Organismus zwei Informationssysteme zur Verfügung, das Nervensystem und das hormonelle System.

Eine Vielzahl der Hormone wird in epithelialen Drüsen gebildet und ihr Sekret durch Kapillarendothelien in die Blutbahn freigesetzt. Für die Steroidhormone existieren zum anschließenden Transport im Blutstrom Transportproteine (Steroidhormonbindende Globuline, SHBG). Am Zielorgan bildet sich ein Hormon-Rezeptor-Komplex, welcher verschiedene Prozesse (Wachstum, Differenzierung) in Gang setzt (36–38).

1.2.1 Steroidhormone

Natürlich vorkommende Steroidhormone leiten sich auf molekularer Basis vom Cholesterin ab. Nach der Bindung an den Lipoprotein-Rezeptor wird Cholesterin von den endokrinen Drüsen durch steroidogene Zellen aufgenommen (39). In diesen Zellen finden die Speicherung sowie die Zuführung zur Steroidogenese statt. Typische Produktionsorte für Steroidhormone bilden Ovarien und Nebennierenrinde. Bei Bedarf werden aus deren Cholesterinvorräten Steroidhormone synthetisiert. Durch den Steroidhormonabbau in der Leber werden an die Steroide nach einer oxidativen Verstoffwechselung entweder Sulfate oder Glucuronsäure an die Hydroxylgruppen konjugiert, was die Ausscheidung aus dem Organismus erleichtert (36,39).

Die Östrogene unterscheiden sich von den anderen Steroidhormonen durch ihren aromatischen A-Ring. Weiter kann man die Steroidhormone auch bezogen auf deren Kohlenstoff-Atom-Anzahl oder dem entsprechenden Rezeptor in fünf Hauptgruppen

einteilen. So unterscheidet man mit je 21 C-Atomen Gestagene, Glucocorticoide und Mineralocorticoide, Androgene mit 19 C-Atomen sowie Östrogene mit 18 C-Atomen.

1.2.1.1 Biosynthese endogener Östrogene

Hauptquelle für Östrogene in der Frau sind die Granulosazellen der Ovarien. Angelehnt an die „Zwei-Zell“-Theorie der Östrogensynthese geht man davon aus, dass die Thekazellen unter Einfluss des Luteinisierenden Hormons (LH) Androgene sezernieren, welche dann in die Granulosazellen diffundieren, um dort durch Aromatisierung in Östrogene umgewandelt zu werden (39,40). Dabei unterscheidet man die natürlich vorkommenden Östrogene 17β -Östradiol (E_2) und Östron (E_1), die im Ovar gebildet werden und Östriol (E_3), welches allerdings in der Leber gebildet wird (39) (Abb. 1.4).

In der Steroidogenese der Ovarien wird E_2 vorrangig in den Follikel umgebenden Granulosazellen gebildet. Hierbei wird Cholesterin über Pregnenolon in Progesteron (P_4), ein Gestagen, umgewandelt. Damit bildet P_4 selbst ein wirksames weibliches Sexualhormon, den Grundbaustein weiterer Steroidhormone (38,41).

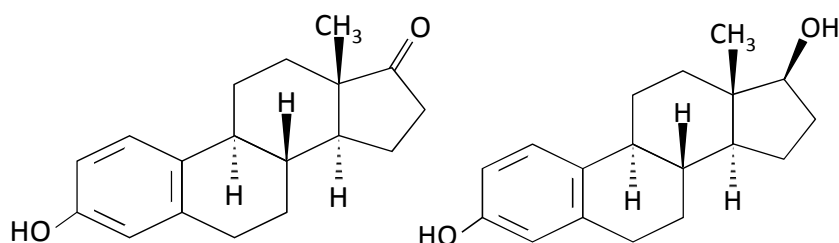


Abb. 1. 4 Strukturformel Östron (E_1) und Östradiol (E_2)

Das in den Thekazellen enzymatisch zu Testosteron umgewandelte Androstendion entsteht aus dem Zwischenprodukt 17α -Hydroxyprogesteron. Die so entstandenen Androgene Androstendion und Testosteron bilden die Basis zur Synthese der Östrogene in der Granulosazelle. Mit Hilfe des Aromatase-Enzym-Komplexes entstehen über eine Aromatisierung des Ringes A, unter oxidativer Entfernung der C-19-Methylgruppe, aus Androstendion Estron (E_1) und aus Testosteron 17β -Estradiol (E_2). Vom E_1 ausgehend kann

weiterhin E_2 entstehen, ausgelöst durch eine katalytische Reaktion der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Abb. 1.5) (42).

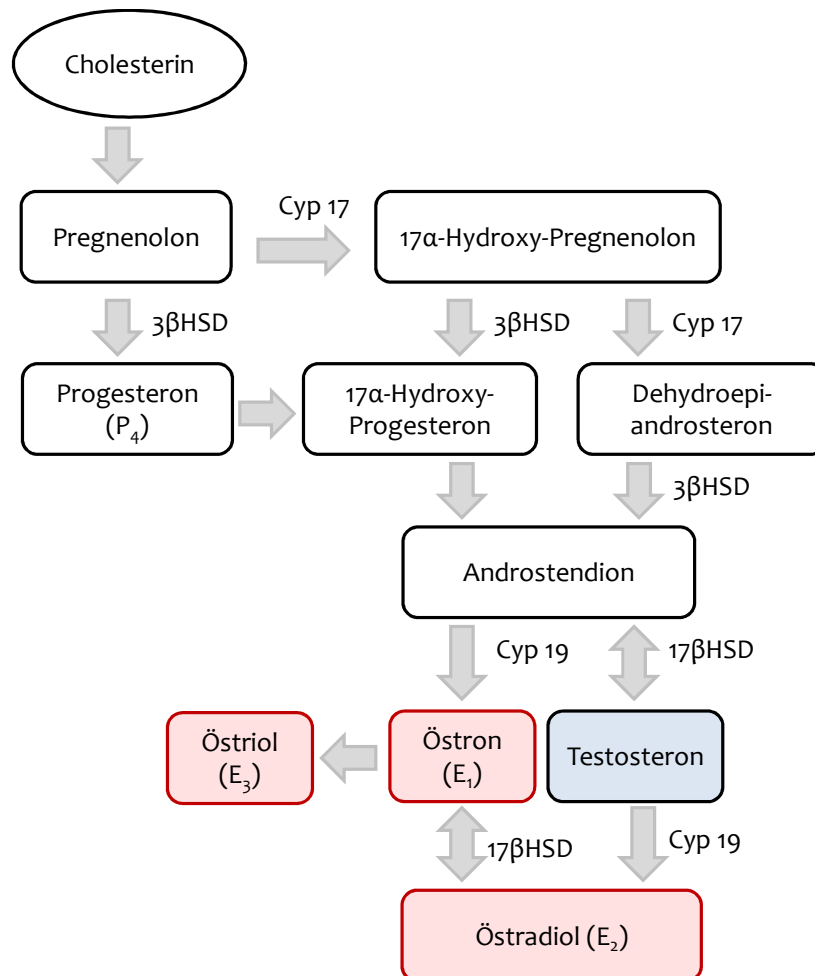


Abb. 1.5 Vereinfachte Darstellung der Hauptwege der Steroidbiosynthese Steroid-17alpha-Hydroxylase (Cyp17), 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β HSD), Estradiol-17beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17β HSD), Aromatase (Cyp19).

Die so entstandenen endogenen Östrogene weisen eine unterschiedlich starke Affinität zu den beiden Östrogenrezeptoren auf. Dabei hat E_1 eine zwei- bzw. zehnmal geringere biologische Wirksamkeit im Vergleich zu E_2 (43). Damit ist E_2 das wichtigste endogene Östrogen im weiblichen prämenopausalen Körper. Der gesamte Vorgang der E_2 -Biosynthese unterliegt zyklischen Schwankungen. Während der proliferativen Phase beim Menstruationszyklus ist der E_2 -Spiegel in höheren Primaten am höchsten. In anderen Säugetieren wird während des Östrus eine erhöhte E_2 -Konzentration gemessen.

Der Östrus ist die Periode, in der das weibliche Tier begattungsbereit ist. In tierexperimentellen Studien, bei denen die östrogene Responsivität in verschiedenen Zielorganen untersucht werden soll, ist es daher notwendig, diese E_2 -Schwankungen auszuschließen. Dazu wird im Allgemeinen die Ovariectomie genutzt. Die Kastration führt zum Ausschalten der gonadalen E_2 -Produktion und damit zu einem starken Absinken der E_2 -Spiegel, wie es auch in der Postmenopause zu beobachten ist. Bei postmenopausalen Frauen ist ein niedriger basaler E_2 -Spiegel auch noch nach der Menopause nachweisbar. Anders als bei dem ovx Tier findet man bei der postmenopausalen Frau systemische E_2 -Spiegel, die insbesondere durch eine E_2 -Produktion des Fettgewebes hervorgerufen werden.

1.2.1.2 Östrogensensitive Gewebe

Die weiblichen Reproduktionsorgane wie Uterus, Vagina und Brustdrüse zählen zu den Zielgeweben der Östrogene. Die Aufgabe der Östrogene ist es, reproduktionsassoziierte Prozesse zu koordinieren. Östrogene wirken sich auf die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane fördernd auf deren Wachstum und Differenzierung aus. Die sich während des 28-tägigen Menstruationszyklus ändernde Hormonkonzentration wird über die Hypothalamisch-gonadal (HPG)-Achse bzw. intraovarielle Mechanismen reguliert. Über einen *feedback*-Mechanismus wird die E_2 -Bildung kontrolliert, die zur Stimulation oder Inhibierung der Bildung des Folikelstimulierenden Hormons (FSH) und des LH führt, welche letztendlich die Synthese der Steroidhormone im Ovar steuern (44). In der Follikelphase wird unter LH Einfluss Progesteron gebildet, das zu den benachbarten Granulosazellen diffundiert. Unter Einwirkung von LH wird es anschließend zu E_2 aromatisiert.

Generell kann man bei den Geweben zwischen klassischen und nicht klassischen Zielgeweben unterscheiden (Tab. 1.1). Die Reproduktionsorgane zählen dabei zu den klassischen Geweben. In den weiblichen Reproduktionsorganen scheint der ER α eine verhältnismäßig hohe Expression zu haben. Zu den sogenannten nicht klassischen Zielgeweben des E_2 gehören unter anderem das Fettgewebe und die Leber. Während im

Fettgewebe beide Östrogenrezeptorsubtypen α und β exprimiert werden, konnte in der Leber nur der ER α nachgewiesen werden.

Tab. 1.1 Östrogensensitive Gewebe
Einschließlich gewebespezifischen Verteilungsmuster der beiden Östrogenrezeptoren;
ER – erhöhte mRNA-Expression; modifiziert nach (45)

Klassisches Zielgewebe		Nicht klassisches Zielgewebe	
Ovarien	ERα /ER β	Leber	ER α
Uterus	ERα /ER β	Fettgewebe	ER α /ER β

Ebenfalls zu den sogenannten nicht klassischen Zielgeweben des E₂ zählt das Fettgewebe. Hemsell *et al.* waren ein der Ersten, welche die Bedeutung des menschlichen Fettgewebes als eine wichtige Quelle der Östrogenproduktion gezeigt haben (46). Daran anschließende Arbeiten konnten zeigen, dass es mit zunehmendem Alter zu einer progressiven Erhöhung von Androstendion kommt, welches im Fettgewebe zu Östron umgewandelt wird (Abb. 1.5). Diese altersbedingte Erhöhung der peripheren Östrogenbildung hängt mit dem Anstieg der Aromataseaktivität als auch einem erhöhten mRNA-Spiegel der Aromatase im Fettgewebe zusammen. Dies ist wichtig, da die Aktivität der Aromatase in erster Linie durch Veränderungen auf Ebene der mRNA reguliert wird (47,48). Eine erhöhte extraglanduläre Östrogenbildung bei Adipositas ist allerdings nicht auf eine erhöhte Aromatase-Expression zurückzuführen, sondern auf die Tatsache, dass eine erhöhte Masse an Fettgewebe vorliegt. Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte Aromatase-Expression, ausgelöst z. B. durch eine erhöhte Interleukin-6 Konzentration im Blut, mit dem Fortschreiten des Alters eintritt (49,50).

1.2.2 Nukleäre Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren, auch ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, bilden eine Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, welche eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase spielen (51–53). Die Rezeptoren regulieren spezifisch die Transkription der Zielgene, in dem sie an deren

Promotorbereich auf der DNA, den sogenannten *Response Elements* binden (54). Diese Bindung kann als Monodimer oft aber als Homo- oder Heterodimer erfolgen. Somit stellen die nukleären Rezeptoren eine direkte Verbindung zwischen extrazellulären hormonellen Signalen und transkriptionellen Antworten her.

1.2.2.1 Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren (ER) gehören zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Es werden zwei Subtypen unterschieden, ER α und ER β . Unterteilt werden dabei sechs funktionale Domänen (Abb. 1.6), welche von acht bis neun Exons kodiert werden.

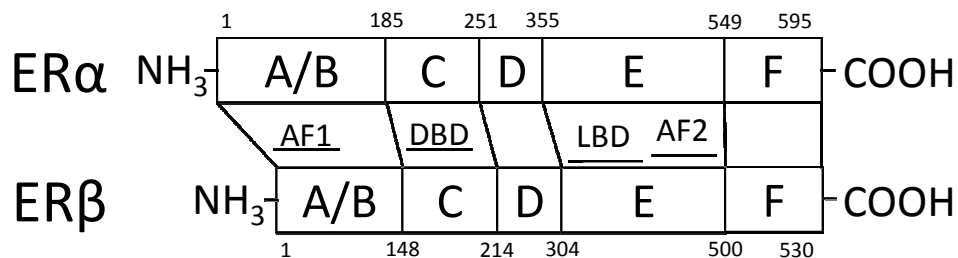


Abb. 1. 6 Aufbau und funktionelle Domänen der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β .

Ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF1); DNA-Bindedomäne (DBD);
Ligandenbindedomäne (LBD); Aktivierungsfunktion 2 (AF2).

modifiziert nach (55)

Die A/B-Domäne ist hinsichtlich ihrer Länge und Sequenz variabel (55). In dieser Domäne befindet sich auch der ligandenunabhängige Transaktivierungsbereich 1 (AF1). Dieser ist sowohl in Protein-Protein-Interaktionen (56–58) als auch in die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen eingebunden (59). Die DBD, auch C-Domäne genannt, ist stark konserviert und besteht aus zwei funktionellen Zink-Finger-Motiven (60). Die beiden Zink-Finger-Motive der DBD dienen der Bindung an die DNA. Zwischen den DBD der beiden ER-Subtypen besteht eine Sequenzhomologie von 97 % (61). Die LBD, E-Domäne, ist mit der DBD durch eine sogenannte *Hinge*-Region verbunden. Mittels LBD wird zwischen Östrogen-Agonisten, Östrogen-Antagonisten und sogenannten Partialagonisten unterschieden. Dabei bewirkt die Bindung des Agonisten die Aktivierung des Rezeptors und katalysiert so verschiedene Signalwege. Die LBD ist aus zwölf Helices

zusammengesetzt und als dreilagiges antiparalleles α -Helix-Sandwichmotiv gefaltet (62). Am Ende der LBD befindet sich eine hydrophobe Bindungstasche (63). Bindet ein Ligand, kommt es auf die Konformation der terminalen Helix 12 an. Kommt es zu einer Bindung eines agonistischen Liganden (E_2) wird die Bindungstasche von der Helix 12 bedeckt, dadurch können koregulatorische Proteine an der Transaktivierungsfunktion 2 (AF2) rekrutiert werden. Bindet allerdings ein antagonistischer Ligand (Fulvestrant) blockiert die Helix 12 die AF2, so ist eine Bindung von Kofaktoren nicht möglich. Bei der Bindung eines partialagonistischen Liganden (Raloxifen) zwingt dessen Seitenkette die Helix 12 in eine Position, welche die AF2 nur teilweise bedecken kann, so es kommt daher nur zu einer teilweisen Rekrutierung von Kofaktoren (60,64). Zwischen den beiden LBD von $ER\alpha$ und $ER\beta$ besteht eine Sequenzhomologie von nur 58 % beim Menschen und nur 55 % bei der Ratte. Daher ist die Affinität einiger Substanzen zu den Rezeptoren verschieden hoch oder es kommt zu unterschiedlichen transkriptionellen Antworten (65,66). Die Verteilung von $ER\alpha$ und $ER\beta$ in den Geweben ist heterogen, so wird primär der $ER\alpha$ im Uterus und der $ER\beta$ hauptsächlich in den Ovarien von Ratten exprimiert (67–69). Weitere metabolische Effekte, die von $ER\alpha$ und $ER\beta$ durch E_2 vermittelt werden, sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

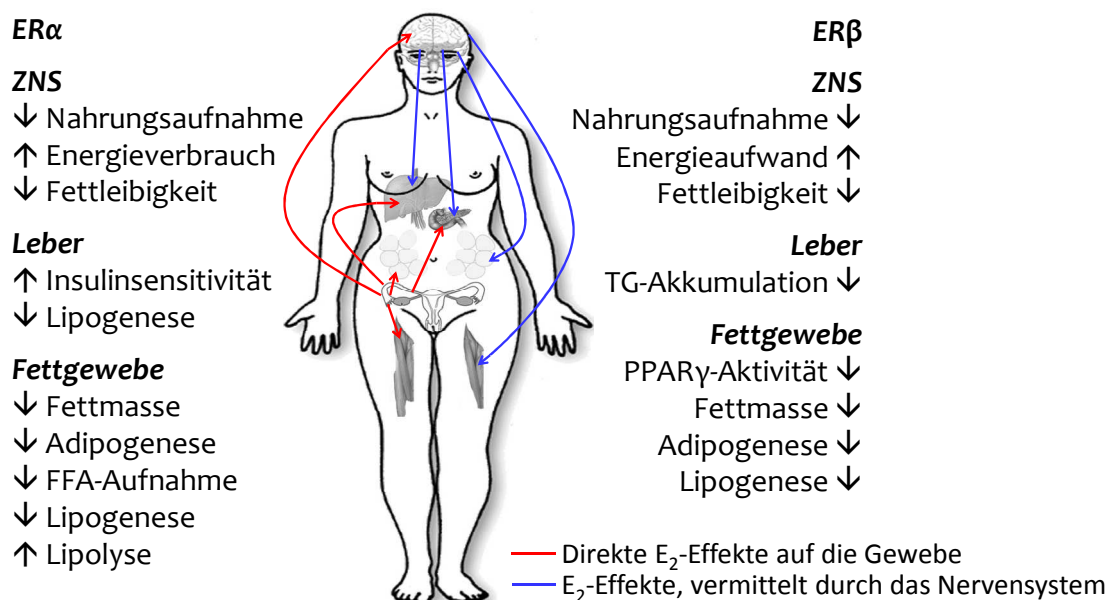


Abb. 1.7 *Metabolische Effekte von $ER\alpha$ und $ER\beta$ im weiblichen Organismus*
 modifiziert nach (70)

Eine Aktivierung des ER α im zentralen Nervensystem (ZNS) vermindert die Nahrungsaufnahme und erhöht den Energieverbrauch, was in einer Verringerung des Körpergewichtes mündet (70). Zusammenfassend kann man sagen, eine Aktivierung des ER α verbessert die Energie- und Glukosehomöostase in verschiedener Weise, wie z. B. durch eine Verbesserung der Insulinsensitivität. Für das Fettgewebe konnte gezeigt werden, dass eine ER α -Aktivierung die Fettmasse verringert (70). Die Aktivierung des ER β im ZNS vermindert ebenfalls die Nahrungsaufnahme und erhöht den Energieverbrauch, was in einem Gewichtsverlust resultiert (70).

1.2.2.1.1 Ligandenabhängige Aktivierung der Östrogenrezeptoren

Bei der Aktivierung der beiden ER unterscheidet man zwischen einem klassischen Wirkmechanismus, welcher über das östrogenresponsive Element (ERE) funktioniert, und zwischen alternativen genomischen und nicht-genomischen Wirkmechanismen.

Wirkmechanismus von E₂ über das östrogenresponsive Element

Im inaktiven Zustand liegen die ER-Subtypen im Zytoplasma, wie auch im Nukleus, als Monomer vor, sie sind Komplexe aus Rezeptor und rezeptorassoziiertem *heatshock*-Protein (Hsp). Durch die Bindung von E₂ an die LBD eines ER-Subtypen kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Affinität der Hsp zum Rezeptor verringert. Durch den so aktivierten Rezeptor werden die Hsp abgetrennt (71) (Abb. 1.8). Der aktivierte E₂-ER-Komplex wird phosphoryliert und diffundiert in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit einem weiteren aktivierten E₂-ER-Komplex, wobei je nach Rezeptorbesatz der Zelle Homo- bzw. Heterodimere entstehen. Diese sind nun in der Lage, die Transkriptionsrate bestimmter östrogenresponsiver Gene zu verändern. Die Mechanismen dafür sind recht vielfältig (Abb. 1.8).

Zwei aktive E₂-ER-Komplexe binden als Dimer an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich östrogenabhängiger Zielgene an den sogenannten EREs. Unter Einbeziehung der zelltypabhängigen Koaktivatoren bzw. Korepressoren findet die Aktivierung bzw. Inhibierung der Zielgentranskription statt. Der klassische Wirkmechanismus von E₂ über ERE ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

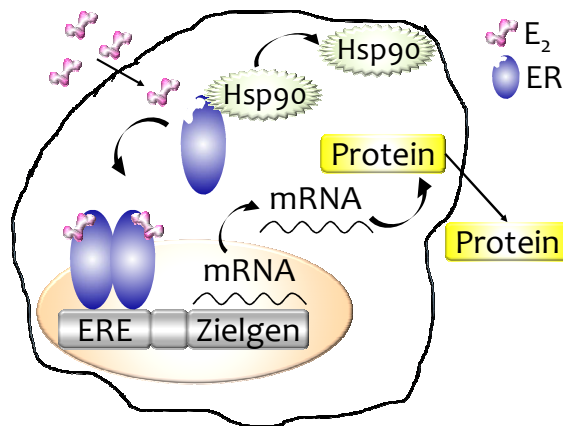


Abb. 1.8 Klassische Wirkmechanismus von E_2 über das ERE
Östrogenrezeptor (ER), heatshock-Protein (Hsp90), 17 β -Östradiol (E_2),
östrogenresponsives Element (ERE)

modifiziert nach (72)

Alternative Wege der E_2 -Wirkmechanismen

Zusätzlich zu dem sogenannten klassischen Wirkmechanismus des E_2 über ERE können die E_2 -ER-Komplexe auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, die an die DNA gebunden sind. Dazu gehört die Regulation der Transkription von Genen, deren Promotorbereich ein AP-1-Element besitzt (Abb. 1.9).

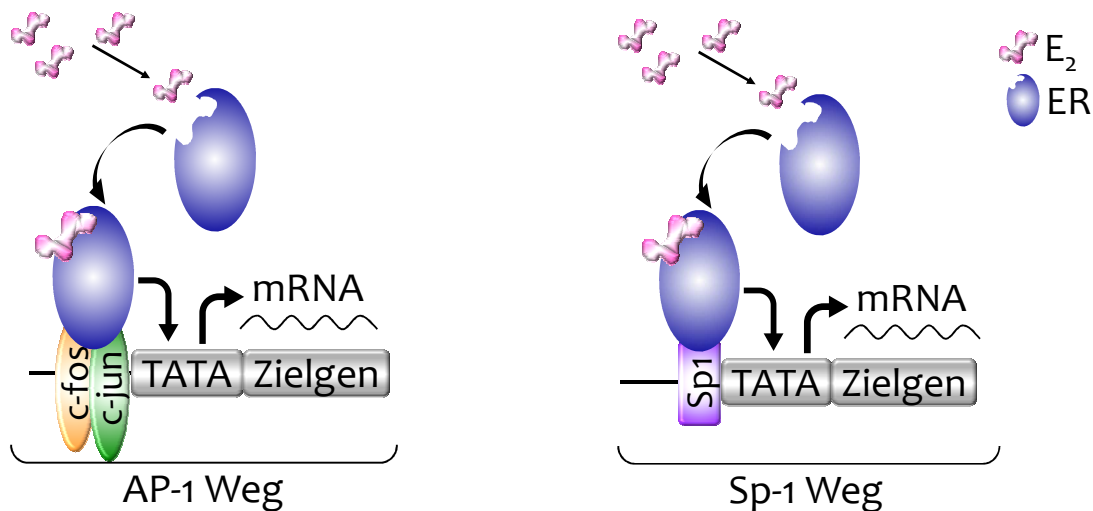


Abb. 1.9 Alternative genomische Wirkmechanismen von E_2 über AP-1 bzw. Sp-1

modifiziert nach (72)

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor bestehend aus einem heterodimeren Proteinenkomplex aus c-Fos und c-Jun Monomeren. In diesem Fall interagiert ein ER-Monomer mit einem

Jun/Fos-Komplex (73). Dabei kommt es zu einer verstärkten Bindung des Jun/Fos-Komplexes, welches die Expression der nachgeschalteten Gene, wie dem TNF α , anregt (74).

Ein ebenfalls bekanntes Beispiel für eine indirekte Modulation der Genexpression durch E₂ ist die Interaktion eines aktivierten ER α mit dem Transkriptionsfaktor SP1 (Abb. 1.9) (75). Dabei bindet ein Proteinkomplex aus ER und SP-1 an eine Kombination aus ERE und SP-1 in der Promotorregion des Zielgens und reguliert so die Expression verschiedener Gene wie c-myc (76) oder des Retinolsäure-Rezeptors (77).

In Abbildung 1.10 wird eine weitere Möglichkeit dargestellt, wie E₂ genregulatorisch wirken kann. In diesem Fall interagiert der ER α mit dem NF κ B-Komplex (72) und verhindert so die Bindung an ein NF κ B responsives Element (NF κ B RE) in der DNA. Dadurch wird auch die Expression der Zielgene unterdrückt. So inhibiert E₂ auf indirektem Weg z. B. die Expression von IL-6 (78).

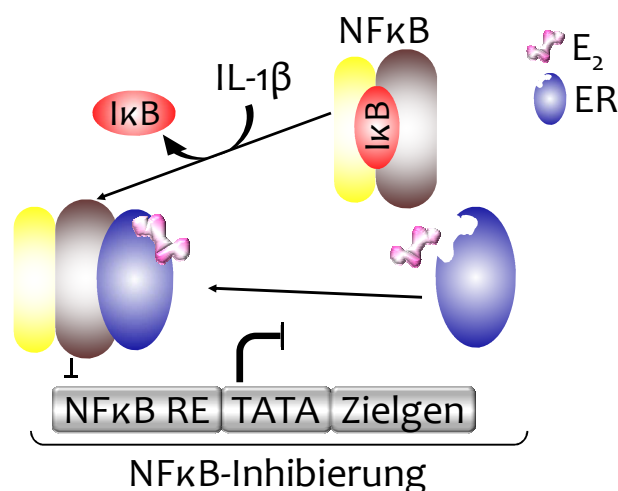


Abb. 1. 10 NF κ B-Inhibition durch E₂

modifiziert nach (72)

Über die ERE-unabhängigen ligandenabhängigen Wege von AP1, NF κ B und SP-1 werden im Uterus etwa 30 % der östrogensensitiven Gene reguliert (39,72,79).

Nicht-genomische Wege der E₂-Wirkmechanismen

Einige physiologische Reaktionen nach einer E₂-Stimulation ereignen sich innerhalb weniger Minuten. Diese Effekte können nicht auf Veränderungen in der Genexpression zurückgeführt werden, sondern sind direkte Interaktionen mit membranständigen Rezeptoren. Diese membranständigen Rezeptoren scheinen in der Wirkung ihren intrazellulären Pendanten ähnlich zu sein (80). Daher wird verstärkt der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 30 (GPCR30) diskutiert. Dieser soll in der Lage sein, E₂ spezifisch zu binden und so schnelle nicht-genomische Antworten zu vermitteln (81,82). Bekannte Beispiele für solche schnellen E₂-vermittelten Signalweiterleitungen sind die Aktivierung von Tyrosinkinasen (83), die vermehrte Produktion von cAMP (84) aber auch die Beeinflussung der MAPK- (85) sowie PI3-Signalwege (86).

Neuere Studien zeigen allerdings, dass der GPCR30 eher ein Interaktionspartner des ER für intrazelluläre Signalweiterleitung ist als ein direkter Rezeptor für Östrogene (87).

1.2.2.1.2 Ligandenunabhängige Aktivierung der Östrogenrezeptoren

Neben der ligandenabhängigen Aktivierung der beiden ER existiert auch eine ligandenunabhängige Aktivierung der ER. Dies geschieht durch eine Interaktion anderer Signalkaskaden mit dem ER. Auf diese Art und Weise können die ERs auch bei Abwesenheit der Liganden aktiviert werden. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter sowie Substanzen, welche die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktivieren (88).

1.2.2.1.3 Koregulatoren

Unter Koregulatoren versteht man zelluläre Faktoren, welche durch Nukleäre Rezeptoren rekrutiert werden. Sie fungieren ergänzend als Vermittler der zellulären Antwort auf endokrine Signale. Es wird grundsätzlich in Koaktivatoren, Korepressoren und Kointegratoren unterschieden (72).

Als Koaktivatoren bezeichnet man Proteine, welche die Transkriptionsrate steigern. Dazu zählen z. B. die Steroidrezeptor-Koaktivatoren 1 - 3 (SRC1 - SRC3). All diesen Proteinen ist eine sogenannte NR-Box gemein, die die primäre Bindestelle für Interaktion mit diversen

Koregulatoren darstellt. Die SRC Koaktivatoren sind im Besitz zweier separater Transkriptionsaktivierungsdomänen, die an der Rekrutierung weiterer Proteine wie Koaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase (CARM1) beteiligt sind (72). Weiterhin sind SRC1 und SRC3 über eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität in der Lage, die DNA zu verändern, um so den Zugang der Transkriptionsmaschinerie zu erleichtern (72).

Kointegratoren sind Proteine, welche nicht selber an die DNA binden, sondern über Koregulatoren rekrutiert werden. Dazu zählen unter anderem p300 und das CREB Binding Protein (CBP), welche die Transkription durch synergistische Einwirkungen auf den ligandengebundenen ER α fördern (72).

Korepressoren sind Proteine, die die Transkription hemmen. So zeigen z. B. die Proteine RIP140 und *Short Heterodimerisation Partner* (SHP) eine negative Koregulator-Funktion, indem sie *in vivo* die SRC1 Koaktivatoren antagonisieren. Dabei konkurriert SHP um die AF2-Bindestelle, kann aber durch die fehlende DBD die Transkription nicht induzieren (89). Es werden weiterhin auch konventionelle Korepressoren wie *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors* (SMRT) bzw. *Nuclear Receptor Corepressor* (N-CoR) beschrieben. In Anwesenheit eines antagonistischen Liganden binden diese konventionellen Korepressoren an den ER α , um im Anschluss daran über eine Histon-Deacetylase-Aktivität den Zugang der Transkriptionsmaschinerie zur DNA zu erschweren (90).

1.3 Östrogendefizienz

Ein Mangel an E₂ wirkt sich auf den gesamten Organismus aus, da, wie in Kapitel 1.2.1.2 bereits beschrieben, Östrogene wichtige Funktionen in den meisten Organsystemen haben. Eine natürliche Östrogendefizienz stellt dabei die Menopause im Menschen dar (Kapitel 1.3.1). Daneben gibt es noch die Möglichkeiten künstlich erzeugter Östrogendefizienz im Tiermodell, wie z. B. die Ovariectomie (Kapitel 1.3.2) oder das Entfernen eines Genes, welches für die Synthese von Aromatase verantwortlich ist (Kapitel 1.3.2). Eine weitere Möglichkeit, eine Östrogendefizienz im Tiermodell zu erzeugen, ist das Entfernen der Östrogenrezeptoren, wodurch für das E₂ keine Möglichkeit mehr besteht einen E₂-ER-Komplex einzugehen.

1.3.1 Menopause

Die Menopause ist das Resultat der Östrogendefizienz. Den Verlauf des Verlustes der Östrogenproduktion kann man in vier größere sich überlappende Abschnitte einteilen (Abb. 1.11). Den ersten Abschnitt im Verlauf des Verlustes der Östrogenproduktion bildet die Prämenopause. Sie beginnt unauffällig oft um das 35. Lebensjahr und ist gekennzeichnet durch eine Verringerung der reproduktiven Hormone. An diese Phase schließt die Perimenopause an, hier findet im eigentlichen Sinne die hormonelle Veränderung statt. In die Perimenopause eingebettet liegt der Zeitpunkt der Menopause, bei der die letzte ovariell gesteuerte Menstruation stattfindet, was nur retrospektiv festgestellt werden kann. In dieser Phase treten die klassischen Symptome der Menopause wie Hitzewallung und Gemütsschwankungen auf. Das permanente Ausbleiben der Menstruation resultiert aus dem Verlust der ovariellen follikulären Aktivität. E_2 und FSH werden oft als indirekte Marker zur Bestimmung des postmenopausalen Status verwendet, sie gelten aber als ungenau, da beide Werte in der prämenopausalen Phase stark schwanken (91).

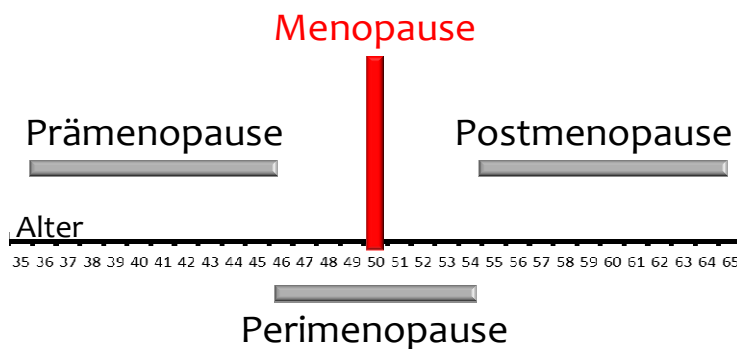


Abb. 1. 11 Verlauf der Menopause

Der Zeitpunkt der Menopause kann erst dann definiert werden, wenn zwölf Monate nach der letzten spontanen Menstruation vergangen sind. Abgeschlossen wird dieser Prozess von der Postmenopause. Diese ist gekennzeichnet durch Symptome, die erst nach einer längeren Östrogendefizienz auftreten, wie Osteoporose.

1.3.1.1 Zusammenhang Metabolisches Syndrom und Menopause

Obwohl das MetS hauptsächlich aus Erkrankungen des Glukose- und Fettstoffwechsels besteht, gibt es überzeugende Hinweise auf eine Verbindung zum Östrogenspiegel (92). Dabei spielt die Ansammlung abdominellen Fettgewebes eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass nach der Menopause das abdominelle Fettgewebe auf ein Niveau vergleichbar dem der Männer ansteigen kann. Die Menopause bildet einen Übergang, der assoziiert ist, mit einer signifikanten Gewichtszunahme von im Schnitt 2-2,5 kg über einen Zeitraum von drei Jahren (93). Ferner wurden bei postmenopausalen Frauen eine erhöhte Fettmasse nachgewiesen, wie auch ein erhöhter Serum-Leptinspiegel (94). Dadurch steigt auch das Risiko für Frauen nach der Menopause an KHK zu erkranken (95,96). Darüber hinaus neigen Frauen in der Postmenopause zu einer erhöhten Prävalenz für Bluthochdruck und *Diabetes Mellitus* Typ2, verglichen mit dem Risiko, welches sich für Frauen in der Perimenopause nachweisen ließ. In den USA sind ca. 40 % aller postmenopausalen Frauen von den Symptomen des MetS betroffen (97). Mehr oder weniger lässt sich aber sagen, mit der Menopause verschlechtert sich das metabolische Profil, was aber unabhängig vom chronologischen Altern ist (93,95).

Das Fettgewebe ist die wichtigste Quelle für Östradiol bei Frauen nach der Menopause (98). Wie in Kapitel 1.4 noch ausführlicher beschrieben wird, ist das Enzym Aromatase ein Katalysator der Östrogenbiosynthese im Fettgewebe. In postmenopausalen Frauen steht der zirkulierende Östrogenspiegel linear im Zusammenhang zu Adipositas, das heißt, je adipöser eine postmenopausale Frau ist, desto höher ist ihr Östrogenspiegel (99). Diese Korrelation von Gewichtszunahme und dadurch erhöhte Aromataseaktivität lässt das Risiko für Brustkrebs stark ansteigen (100).

1.3.2 Experimentelle Modelle für Östrogenprüfung

Zur Prüfung von Substanzen auf ihre Östrogenität werden unterschiedliche Modelle verwendet. Zwei Modelle, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, werden im Folgenden genauer beschrieben.

Uterotropher Assay

Der uterotrophe Assay gehört zu den etablierten *in vivo* Tests, welcher zur Prüfung eines östrogenen Potentials herangezogen wird. Für diesen Assay liegt eine Vielzahl an Protokollen vor, am häufigsten wird aber die der *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) verwendet (101,102). Je nach Fragestellung werden ovariectomierte adulte weibliche Tiere, immature Tiere oder gendefekte Tiere verwendet. Allen Tieren ist es somit nicht möglich, während der Behandlungszeit Östrogen selbst zu synthetisieren. Den adulten weiblichen Tieren werden die Ovarien entfernt und somit die primäre Östrogenquelle. Als Kontrolle dienen adulte weibliche Tiere, die nicht der Ovariectomie unterzogen werden, es findet eine Schein-(*sham*)Operation statt. Nach einer 14-tägigen Erholungs- und Hormon-Deprivationsphase beginnt die Behandlung. Die Applikation der Behandlungssubstanz kann oral oder subkutan erfolgen und findet an drei aufeinanderfolgenden Tagen, jeweils im Abstand von 24 Stunden statt. Am vierten Tag wird die Sektion durchgeführt.

Erfolgt im Anschluss an die Ovariectomie eine Exposition mit E_2 , kann im ovx Tier eine Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes beobachtet werden. Diese Gewichtszunahme resultiert aus Wassereinlagerungen. Bisher ist ungeklärt warum dieser Test auch in juvenilen Tier funktioniert.

Aromatase-Mangel

Zusätzlich zum natürlichen Verlust der Östrogenproduktion (Menopause) und dem Verlust durch einen chirurgischen Eingriff (ovx) kann eine Östrogendefizienz auch durch den Mangel oder das Nichtvorhandensein von Aromatase hervorgerufen werden. Aromatase ist das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Östradiol. Deshalb ist die Entfernung des Aromatase-Gens *Cyp19A1* eine weitere Möglichkeit, eine Östrogendefizienz zu erzeugen, wie dies z. B. in der Aromatase-knockout-Maus geschehen ist (103,104). Aromatasedefizienz ist beim Menschen eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit (105,106). Sie beruht auf verschiedenen Mutationen in der kodierenden Region des *Cyp19A1*-Gens, was in einer Östrogendefizienz resultiert. Solch eine Mutation im Menschen wurde erstmalig 1995 beschrieben. Dabei konnte gezeigt

werden, dass durch den Überschuss an Androgenen unter anderem das Altern des Knochens verzögert wird (107).

1.4 Aromatase

Aromatase ist ein Enzym, welches die Östrogen-Biosynthese katalysiert (Abb. 1.5) (108). Es gehört zu der Cytochrom P450-Enzymgruppe und ist der einzige Vertreter der sogenannten Gruppe Cyp19 (109). Das Hämprotein ermöglicht eine Bindung des C19 androgenen Steroids substrats und katalysiert eine Reihe von Reaktionen, welche zur charakteristischen Bildung des phenolischen Rings A in E_2 beitragen. Das humane CYP19 Gen wurde vor ein paar Jahren geklont (110), es konnte dabei gezeigt werden, dass die kodierende Region neun Exons umspannt, beginnend mit Exon zwei.

Durch den Einfluss gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren wird die Transkription der Aromatase-RNA an unterschiedlichen Stellen initiiert. Dafür finden sich verschiedene Aromatase-Genpromotoren (Abb. 1.12).

Für das humane Aromatase-Gen befindet sich die ATG-Translations-Startseite im kodierenden Exon II (111). Aufsteigend liegen auf dem Gen verschiedene Promotoren. Der proximal liegende Promotor II ist der gonadenspezifische Promotor und der Promotor I.3 wird im Fettgewebe genutzt (Abb. 1.12).

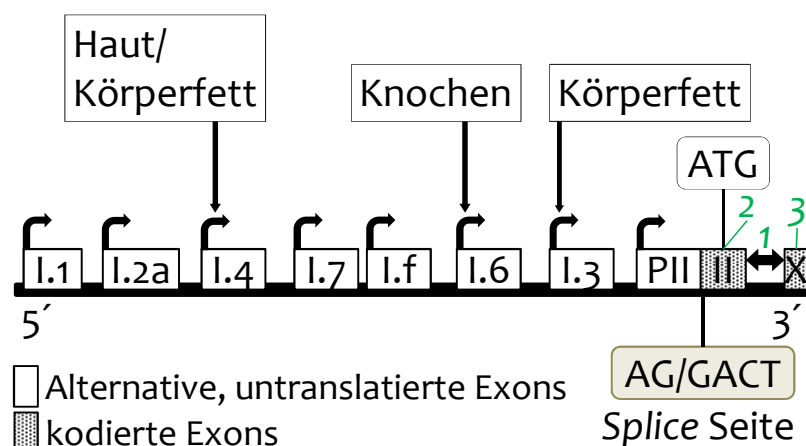


Abb. 1. 12 Aromatase-Gen (Cyp19)

Die Expression des Aromatase-Gens wird gewebespezifisch von Promotoren reguliert.

(1) Coding Region; (2) Coding Exon II; (3) Coding Exon X

modifiziert nach (111)

Die ovarielle Expression von Aromatase wird vornehmlich vom FSH-Rezeptor, der cAMP-Produktion und der Aktivierung des proximalen Promotors II vermittelt (112). Männer wie auch postmenopausale Frauen produzieren allerdings E_2 durch Aromatase in extragonadalem Gewebe wie dem Fettgewebe (Abb. 1.13) (112).

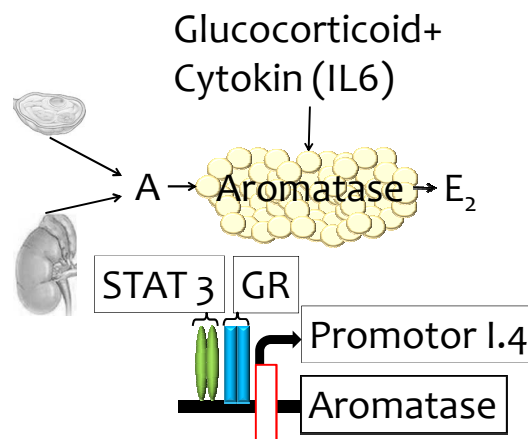


Abb. 1.13 *Physiologische Regulation der Aromatase Expression*
Kombination aus Glukokortikoid und eines Klasse 1 Cytokins induzieren die Aromatase Expression im Fettgewebe über den Promotor I.4. STAT-3 und Glukokortikoid Rezeptor (GR) binden an den Promotor I.4, um die Aromatase Expression zu vermitteln.
modifiziert nach (111)

1.4.1 Die Aromatase-knockout-Maus

Unabhängig voneinander wurde durch Fisher *et al.* und Toda *et al.* das Aromatase-knockout (ArKO)-Mausmodell erzeugt. Dieses Mausmodell zeigt Defekte durch Östrogendefizienz, welche durch das Entfernen des *Cyp19*, Aromatase-Gen, hervorgerufen werden (103,104). Für die Entwicklung des ArKO-Mausmodelles wurde der *inbred*-Mausstrang C57Black/6J/J129 verwendet. Diesem Mausstamm wurde das Exon 9, ein hoch konserviertes und wichtiges Exon, auf dem *Cyp19*-Gen, gezielt zerstört (103). Durch das Zerstören des Aromatase-Gens zeigen sich in dem Mausmodell klassische Anzeichen einer Östrogendefizienz. Der wichtigste Phänotyp der ArKO-Maus ist der Verlust der Fertilität für beide Geschlechter. Für die weiblichen ArKO-Mäuse liegt dies unter anderem daran, dass die Follikelreifung unterbrochen wird und es so keine Möglichkeit der Ovulation gibt (113). Durch die E_2 -Deprivation ist in der ArKO-Maus die

Funktion der HPG-Achse gestört (103). Dadurch sind die Grundspiegel von LH und FSH im Serum der ArKO-Maus erhöht und bleiben auch im Alter auf diesem Level, verglichen mit der Wildtyp (WT)-Maus (103,113). Die ArKO-Maus weist keinen Vaginalzyklus, Indikator für den Östrus, auf. Sie verbleibt dadurch dauerhaft in der Phase von Diöstrus und Proöstrus (103). Weiter ist der Uterus der ArKO-Mäuse, bedingt durch das fehlende E_2 , deutlich unterentwickelt. Das Uterusfeuchtgewicht der ArKO-Mäuse beträgt lediglich 40 % von dem der WT-Mäuse (103,113,114). Weitere Anzeichen sind zum einen eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes, was das Resultat einer exzessiven Akkumulation an Fettgewebe ist (Abb. 1.14) (115,116). Zusätzlich zu der in den Mäusen bestehenden Adipositas konnte eine Hypercholesterinämie festgestellt werden. Das Serumlipid-Profil in ArKO-Mäusen verändert sich mit zunehmendem Alter dahingehend, dass beide Geschlechter erhöhte Cholesterinwerte und einen signifikant erhöhten Serumleptin-Spiegel aufweisen (116).

Ein Teil der phänotypischen Veränderungen ist durch eine Behandlung mit E_2 reversibel, die Fertilität ist aber nicht wieder herzustellen (104).

Während in Mäusen und Menschen bisher nur ein Cyp19-Gen beschrieben wurde, konnten in Knochenfischen hingegen zwei funktionelle Formen des Aromatase-Gens nachgewiesen werden (117). Eine Aromataseaktivität wurde in vielen Geweben des Menschen nachgewiesen (118).



Abb. 1. 14 Aromatase knockout (ArKO)-Maus im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Maus

Ab der 12. - 14. Lebenswoche entwickelt die ArKO-Maus eine progressive Stammfettsucht (119). MRT-Daten zeigten, dass die weiblichen ArKO-Mäuse drei bis viermal mehr Fett aufweisen als die WT-Mäuse. Ebenfalls erhöht ist der Serumleptin-Spiegel, dabei konnte in weiblichen ArKO-Tieren dreimal mehr zirkulierendes Leptin nachgewiesen werden als in den weiblichen WT-Tieren. Alle bisher erhobenen Daten liegen im Einklang mit dem Grad einer Adipositas. Eine Messung des Seruminsulins zeigte, dass die ArKO-Mäuse beginnen eine Hyperinsulinämie zu entwickeln (116). Die Serumglukose-Spiegel allerdings bleiben in einem Gleichgewicht, was darauf hinweist, dass die Tiere keinen vollständigen *Diabetes mellitus* Typ 2 entwickeln. Trotz der ausgeprägten Adipositas zeigte das Körpergewicht insgesamt keinen so dramatischen Anstieg wie er für das Fett beobachtet wurde. Begründet wird dies von Simpson *et al.* damit, dass die fettfreien Körpermassen, wie zum Beispiel die Muskelmasse, an Gewicht verlieren (119). Anhand von Studien das Energie-Gleichgewicht betreffend konnte gezeigt werden, es gibt keine Änderung des Ruheenergieumsatzes oder der Fettoxidation. Allerdings kam es zu einer 50%igen Reduktion der Glukoseoxidation als auch zu einem Rückgang der Bewegungsaktivität der Tiere (119).

Zusätzlich zu all den beschriebenen Veränderungen wurde auch ein verringertes Hirngewicht bei der ArKO-Maus festgestellt, was aus 30 % weniger Neuronen im frontalen Cortex resultiert (120).

1.5 Exogene Liganden der Östrogenrezeptoren

Östrogenrezeptoren können zusätzlich zu den humanen endogenen Östrogenen auch mit Xenoöstrogenen interagieren. Xenoöstrogene können eine östrogene oder antiöstrogene Wirkung im Organismus auslösen. Man teilt Xenoöstrogene in diverse Untergruppen ein (Abb. 1.15). Dabei unterscheidet man zwischen synthetischen Östrogenen und natürlichen Östrogenen. Synthetische Östrogene finden ihren Einsatz als Therapeutika bei hormonbedingten Krankheiten oder bei der Empfängnisverhütung. Vertreter dieser Gruppe sind Diethylstilbestrol (DES), Ethinylöstradiol und Mestranol.

Es gibt allerdings auch synthetische Östrogene, die eine nicht beabsichtigte östrogene Wirkung auf Mensch und Tier ausüben. Substanzen, die solche ungewollten negativen

Effekte auf das Hormonsystem besitzen, werden als endokrin wirksame Substanzen (EDCs) oder auch endokrine Disruptoren bezeichnet. Zu solchen endokrinen Disruptoren zählen Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und Polychlorierte Biphenyle (PCB).

Natürliche Östrogene wiederum teilen sich in Phytoöstrogene und Mycoöstrogene auf. Lignane (Secisolarciresinol) und Flavonoide gehören in die Gruppe der Phytoöstrogene. Wobei die Flavonoide letztendlich in Isoflavone (121) (Bsp. Genistein), Coumestane (122,123) (Bsp. Coumestrol), und Flavanone (121) (Bsp. 8-PN) gegliedert werden (124).

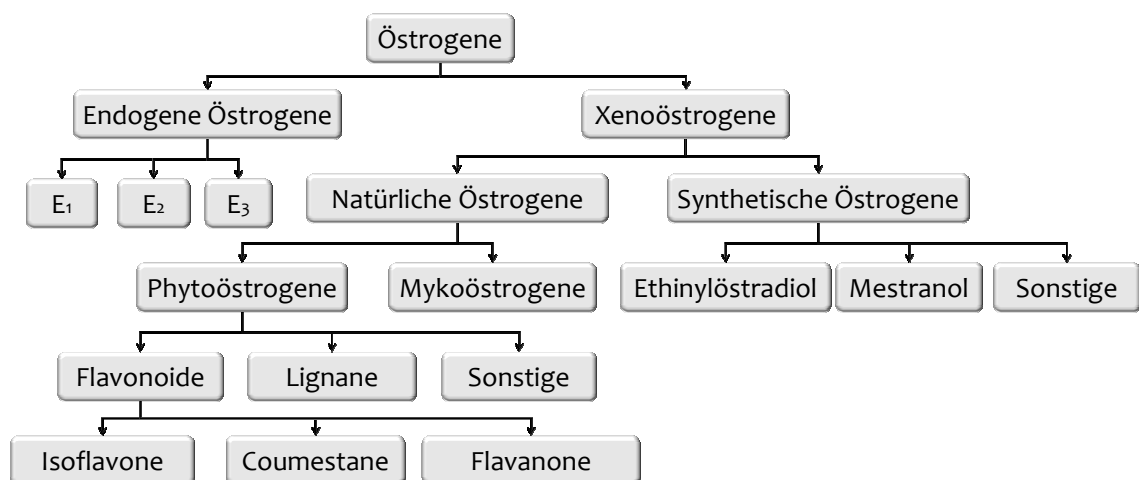


Abb. 1. 15 Einteilung von Östrogenen

1.5.1 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzenstoffe, zu denen, wie in Abbildung 1.20 zu sehen ist, Flavonoide und Lignane gehören. Im chemischen Sinne sind sie keine Östrogene obwohl sie eine funktionelle Ähnlichkeit zu endogenen Östrogenen aufweisen. Vielmehr sind es polyphenolische Substanzen nicht steroidaler Struktur. Ihre strukturelle Ähnlichkeit ermöglicht es, an die Östrogenrezeptoren zu binden und dadurch östrogene oder antiöstrogene Effekte auszulösen.

Durch tierexperimentelle Studien konnte gezeigt werden, dass die östrogenähnlichen Effekte der Phytoöstrogene das Wachstum des weiblichen Genitaltraktes stimulieren wie auch den Zyklus induzieren und Reaktionen im zentralen Nervensystem auslösen (125,126).

Bekannte Vertreter aus der Gruppe der Phytoöstrogene sind das Soja-Isoflavonoid Genistein und das aus der Hopfenpflanze stammende 8-Prenylnaringenin (126). Isoflavonoide findet man vorwiegend in Leguminosen, besonders hohe Menge konnten in der Sojabohne nachgewiesen werden. Die beiden Hauptvertreter dabei sind Genistein und Daidzein, die in Form ihrer Glykoside Genistin und Daidzin in einem Verhältnis 5:4 in der Sojabohne vorliegen. Sie zählen auch zu den am besten charakterisierten Isoflavonoiden. 8-PN gehört zur Gruppe der prenylierten Flavonoide, welche man in den Gattungen *Citrus* und *Humulus lupulus* vorfindet. Die relative Bindungsaffinität der Phytoöstrogene zu den Östrogenrezeptoren ist für jede Substanz spezifisch (Tab. 1.2) (39).

Die Bindungsaffinität von 17β -Östradiol zu $ER\alpha$ und $ER\beta$ wird hierbei auf 100 % gesetzt. Das Soja-Isoflavonoid Genistein hingegen bindet mit einer höheren Affinität zu $ER\beta$ als zu $ER\alpha$ (39). Auch Coumestrol bindet deutlich besser an der $ER\beta$ als an $ER\alpha$.

Tab. 1. 2 Relative Bindungsaffinität östrogenwirksamer Substanzen in %

Ligand	Östrogen-Rezeptor α	Östrogen-Rezeptor β
17β - Östradiol (43)	100	100
Raloxifen (39)	69	16
Genistein (127)	4	87

Genistein

Genistein (Abb. 1.16) ist ein natürliches Isoflavonoid, welches in einer Vielzahl Pflanzen vorkommt, wie in der Sojabohne und im Rotklee. Es bindet mit einer unterschiedlichen Affinität an die Östrogenrezeptoren α und β (43). Dem Genistein können fördernde Effekte auf verschiedene Gewebe als Phytoöstrogen und als spezifischer Tyrosin-Kinase-Inhibitor nachgewiesen werden (128). Ebenso zeigt Genistein ein sich klar vom Östradiol unterscheidendes Wirkprofil auf. Genistein aktiviert direkt die Zellfunktion über die cAMP/PKA abhängige extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) (129). Die von

Genistein induzierte PKA-Aktivierung sorgt für eine erhöhte Stickstoffoxid-Synthese und verbessert so die vaskuläre endotheliale Zellfunktion (130). Es zeigt sich weiterhin, dass Genistein eine dosisabhängige (5 - 200 mg/kg/Tag) anti-fettbildende Wirkung hat (131). Eine Verringerung des Fettgewebes stellte sich bei den weiblichen Mäusen allerdings erst bei einer oral verabreichten pharmakologischen Dosis (200 mg/kg/Tag) ein. Der Einsatz ernährungsrelevanter Dosen (0,05 - 50 mg/kg) von Genistein resultierte in einer leichten Zunahme des Fettgewebes und einer milden peripheren Insulinresistenz. Es konnte bei lebenslang erhöhtem Genuss genisteinreicher Nahrung eine verringerte Inzidenz zum MetS und Brustkrebs festgestellt werden (132). So zeigt sich bei Asiatinnen, die eine deutlich höhere Menge an Soja-Produkten zu sich nehmen, eine erhöhte Serumkonzentration von Genistein gegenüber Frauen, die einen westlichen Lifestyle leben (133).

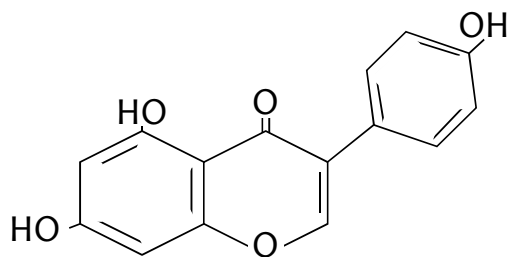


Abb. 1. 16 Strukturformel von Genistein

Über die Wirkung des Genistein auf menopausale Beschwerden ist das Datenmaterial sehr widersprüchlich. Eine Aufnahme von 30 mg/Tag von Soja-Isoflavonen (oder zumindest 15 mg Genistein) reduziert z. B. Hitzewallungen um bis zu 50 % (134). Für Genistein konnten geringfügige positive Effekte auf den Erhalt der Knochendichte gezeigt werden (135–138).

8-Prenylnaringenin

8-PN (Abb. 1.17) gehört zu einem der wirksamsten Phytoöstrogene. Es ist in den weiblichen Blüten des Hopfens zu finden und kann auch im Bier nachgewiesen werden (139). Mittels eines Rezeptorbindungsassays wurde eine Östrogenität *in vitro* für 8-PN nachgewiesen (140,141). In Versuchen mit Mäusen, bei denen als Positivkontrolle E₂ in

einer Konzentration von 10^{-10} mol/L und 8-PN mit einer Dosis vom 10^{-7} mol/L verwendet wurde, konnten vergleichbare Wirkungen auf den Uterus als auch auf die Knochendichte nachgewiesen werden (140). Zum Nachweis eines uterotrophen Effektes von 8-PN bei Mäusen braucht man lediglich eine 10-fach niedrigere Dosis verglichen mit Genistein (142). Bei Genexpressionsanalysen zeigte sich eine östrogenabhängige Regulation der Gene ER α und Clusterin, allerdings war die Dimension der Regulation geringer im Vergleich zu E₂-behandelten Tieren (143). Für 8-PN konnte bisher keine organspezifische Wirkung nachgewiesen werden. Gezeigt werden konnte aber, dass 8-PN seine Wirkung primär über den ER α vermittelt (144). Therapeutisch wird 8-PN zur Behandlung von menopausalen Beschwerden vorgeschlagen, da es auf den Erhalt der Knochendichte einen positiven Effekt auslöst (145,146).

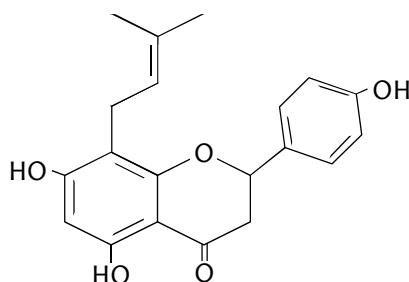


Abb. 1. 17 Strukturformel von 8-PN

Phytoöstrogene in der Nahrung

Die westliche Ernährung ist geprägt von einem hohen Fett- und Fleischkonsum, wohingegen die traditionelle asiatische Ernährung auf pflanzlichen Lebensmitteln basiert die ballaststoffreich sind. Das bekannteste Lebensmittel ist in dem Zusammenhang die Sojabohne, aus dem Produkte wie Tofu, Tempeh oder die Miso-Suppe verzehrt werden. Von anderen Lebensmitteln unterscheidet sich die Sojabohne durch ihren vergleichsweise hohen Gehalt an Phytoöstrogene (147).

Die in pflanzlichen Lebensmitteln befindlichen Isoflavonoide Genistein und Daidzein liegen überwiegend als Glykoside vor (148,149). Sie sind kovalent an Zucker, wie Glukose oder Galaktose, gebunden. Die genauen Resorptionswege der Glykoside werden zurzeit noch diskutiert. Die Bioverfügbarkeit diätischer Isoflavonoide ist abhängig von einer

Vielzahl an Faktoren und aus diesem Grund sehr individuell. So spielt neben der Mikroflora und der Aufenthaltsdauer im Darmtrakt auch das Geschlecht eine Rolle. Einfluss nehmen auch Substanzen, die parallel zu den Isoflavonoiden eingenommen werden (150,151).

1.5.2 Selektive-Östrogenrezeptor-Modulatoren

Selektive-Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) sind synthetische Verbindungen, deren Wirkung über die Östrogenrezeptoren vermittelt wird (152). Unter den sogenannten SERM-Eigenschaften versteht man selektive, organspezifische und östrogenähnliche Wirkeigenschaften (153). Diese Eigenschaften sind im Gegensatz zu dem natürlichen Liganden Östradiol nicht generalisiert. Sie unterscheiden sich zu den Östrogenen darin, dass sie über keine Steroidstruktur verfügen. Weiterhin gibt es noch sogenannte Phyto-SERMs, deren Wirkstoff aus einer botanischen Quelle stammt. Bekanntester Vertreter dafür ist das Sojaderivat DT56a, welches zur Behandlung von postmenopausalen Beschwerden verwendet wird (154,155). SERMs haben teilweise agonistische bzw. antagonistische Eigenschaften, dies hängt unter anderem von der Struktur des SERMs ab. In Studien konnte gezeigt werden, dass die partielle Agonist/Antagonist-Eigenschaft davon abhängig ist, welche assoziierten Koregulatoren gebunden werden, wenn eine Rezeptor-Liganden-Interaktion erfolgt (152). So spielt das Verhältnis Koaktivator zu Korepressor in den verschiedenen Zelltypen eine wichtige Rolle. Die unterschiedliche Wirkungsweise der SERMs in den Geweben wird unter anderem auch dadurch hervorgerufen, da hier eine spezielle ligandenabhängige Konformation der LBD der Östrogenrezeptoren hervorgerufen wird. Was darin resultiert, dass nur gewisse gewebespezifische Kofaktoren binden können.

Raloxifen

Raloxifen ist ein Benzothiophen-Derivat (Abb. 1.18), nicht steroidal und gilt als eines der ersten synthetisierten SERMs (156,157). Es weist eine ähnliche Bindungsaffinität zu den ER auf wie 17 α -Östradiol.

Dem Raloxifen konnten östrogene Eigenschaften nachgewiesen werden, welches sich positiv auf die Knochendichte postmenopausaler Frauen auswirkt (158). Eine östrogen-induzierte Proliferation wird im Brustgewebe wie auch im Uterus von Raloxifen nicht stimuliert eher inhibiert. Mit einer Risikominimierung für Brustkrebs und Wirbelfrakturen aber einem ausbleibenden protektiven Einfluss auf das Risiko einer KHK zeigt Raloxifen die typischen Eigenschaften eines SERMs (159,160). Studien haben gezeigt, Raloxifen ist in der Lage, den Serum-Gesamt-Spiegel wie auch den LDL-Cholesterin-Spiegel zu senken ähnlich wie Östradiol. Davon Ausgenommen sind allerdings das Serum-Triglyzerid und das C-reaktive Protein. Weiterhin konnte auch nicht gezeigt werden, dass durch eine Raloxifenbehandlung sich das Risiko für eine Herz-Kreislauf-Erkrankung verändert (159).

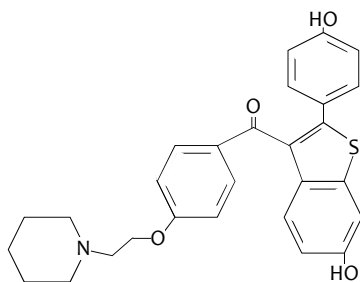


Abb. 1. 18 Strukturformel von Raloxifen

1.5.3 Das Antiöstrogen Fulvestrant

Fulvestrant ist ein reines Antiöstrogen. Im Gegensatz zu Raloxifen und Tamoxifen handelt es sich bei Fulvestrant um ein Steroid (Abb. 1.19). Es findet Verwendung bei der Behandlung von Brustkrebs unter dem Namen Faslodex® (161).

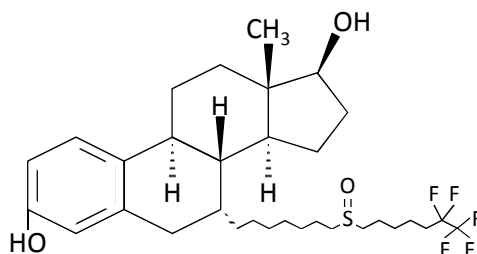


Abb. 1. 19 Strukturformel von Fulvestrant

Bindet Fulvestrant an die LBD des Östrogenrezeptors, so wird die Dimerisierung des ER-Liganden-Komplexes blockiert wie auch die Translokation in den Kern. Die Bindung an das ERE bleibt aus, da die Koaktivatoren an ihrer Bindung gehindert werden (Kap. 1.2.2.1). Dies resultiert in einer verhinderten Regulation von östrogensensitiven Genen.

1.6 Überblick über die Gene, deren Expression untersucht wurde

Die in der vorliegenden Arbeit auf ihr Expressionsmuster untersuchten Gene lassen sich in drei große Gruppen einteilen (Tab. 1.3 - 1.5). Alle in den folgenden Abschnitten verwendeten Gen-Abkürzungen wurden nach den Richtlinien der „*Guidelines for Nomenclature of Genes*“ verwendet (162). Die erste Gruppe umfasste Gene, die als Indikatoren für östrogene Wirksamkeit (Kap. 1.5.1) gelten. In der zweiten Gruppe wurden die Gene zusammengefasst, die mit dem MetS in Verbindung gebracht werden (Kap. 1.5.2). Gene, die eine Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen, wurden in der dritten Gruppe zusammengefasst (Kap. 1.5.3).

1.6.1 Indikatoren für östrogene Responsivität

Die erste Gruppe bilden die Gene, welche bekannt dafür sind, östrogenabhängig in ihrer Expression reguliert zu werden (Tab. 1.3). Die beiden Östrogenrezeptoren *Esr1* und *Esr2* spielen nicht nur eine wichtige Rolle im Mechanismus der östrogenen Wirkung, sie sind gleichzeitig Gene, deren Expression durch E_2 reguliert wird. Im Uterus ist die relative mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* nach E_2 -Behandlung verringert, was die Expression anderer östrogenregulierter Gene ebenfalls schwächen kann (163).

Der Progesteron Rezeptor (*Pgr*) vermittelt hauptsächlich die Wirkung des Steroidhormons Progesteron. Der Promotor des *Pgr* zeigt kein palindromisches ERE, trotzdem unterliegt die Regulation der Transkription des *Pgr* der Kontrolle des E_2 . In tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass die Proteinkonzentration des PGR zwar während des Zeitraums der Untersuchung anstieg, die mRNA-Expression aber nach 24 h ein Maximum erreichte und dann wieder abfiel (164).

Tab. 1.3 Östrogenresponsive Gene, die mittels real-time-PCR untersucht wurden

Genname	Gen	Funktion
Östrogenrezeptor- α	<i>Esr1</i>	endogener Rezeptor für östrogene Liganden
Östrogenrezeptor- β	<i>Esr2</i>	endogener Rezeptor für östrogene Liganden
Progesteron Rezeptor	<i>Pgr</i>	endogener Rezeptor für Gestagene; Östrogenitätsmarker
Lactoferrin	<i>Ltf</i>	sensitives Markergen für östrogeninduzierte Antworten
Clusterin	<i>Clu</i>	östrogensensitives Markergen, <i>down-regulation</i>

Die Expression des Gens Lactoferrin (*Ltf*) reagiert besonders empfindlich auf E_2 im Uterus der Maus. Bisher gibt es keine Beweise, dass die mRNA des *Ltf* durch E_2 in anderen Geweben als dem weiblichen Genitaltrakt geregelt wird (165).

Für Clusterin (*Clu*) wurde eine östrogene Regulation im Endometrium nachgewiesen (166). Beim Menschen wie auch bei Mäusen konnten zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus unterschiedlich hohe Expressionen des *Clu* nachgewiesen werden (167).

1.6.2 Ausgewählte Gene, die im Zusammenhang mit dem MetS unterschiedlich reguliert werden

In der zweiten Gruppe sind die Gene zusammengefasst, die eine Verbindung zur Pathogenese des MetS haben (Tab. 1.4).

Bekannte Markergene des MetS sind unter anderem Leptin (*Lep*), der Leptin Rezeptor (*Lepr*) und der Insulin Rezeptor (*Insr*). Leptin, als Produkt des *ob*-Gens, reguliert die Nahrungsaufnahme, die Insulinaktion sowie die Thermogenese (168), (169).

Der Leptin Rezeptor (*ob*-Rezeptor) gehört zu den *class-1-cytokine* Rezeptoren und stellt den Rezeptor für das fettzellspezifische Hormon Leptin dar. Es existieren ca. fünf Isoformen des Leptin Rezeptors, wobei aber nur die Spleißvariante LEPRb in der Lage ist, die Wirkung des Leptins zu vermitteln (170). Hauptsächlich wird der *Lepr* im

Hypothalamus exprimiert, er wurde aber auch im Fettgewebe (171) und im Ovar (172) nachgewiesen.

Tab. 1. 4 Gene mit Bezug zum MetS, die mittels real-time-PCR untersucht wurden

Genname	Gen	Funktion
Leptin	<i>Lep</i>	Überexpression im MetS
Leptin Rezeptor	<i>Lepr</i>	Rezeptor für fettzellspezifisches Hormon Leptin
Insulin Rezeptor	<i>Insr</i>	stimuliert durch Insulin intrazelluläre Signalkaskaden
<i>insulin-induced gene 1</i>	<i>Insig1</i>	von Insulin reguliert
<i>insulin-induced gene 2</i>	<i>Insig2</i>	Regulator des Lipidmetabolismus
<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>	<i>Srebp</i>	Beteiligt an der Regulation des Cholesterinstoffwechsels
Glucosetransporter-4	<i>Glut4</i>	Insulin regulierter Glucose Transport in die Zelle

Der Insulin Rezeptor ist ein Membranprotein, welches Insulin bindet. Besonders stark wird der *Insr* in den Leber- und Fettzellen exprimiert. Während der Adipozytendifferenzierung erhöht sich die Zahl der Insulin-Rezeptoren (173).

Der Glukosetransporter-4 (*Glut4*) vermittelt den Insulin regulierten Glukosetransport in die Zelle (Abb. 1.20). Die Anzahl der *Glut 4* in der Membran wird durch die Wirkung des Insulin erhöht (174).

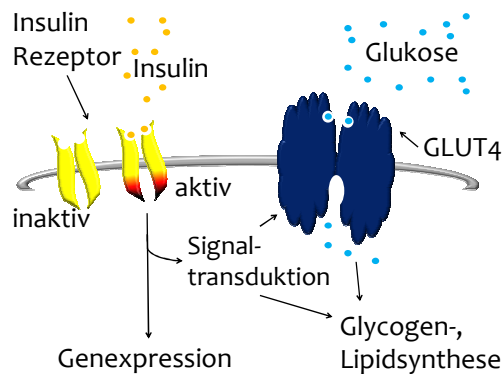


Abb. 1. 20 vereinfachte Darstellung der Interaktion Insulin Rezeptors und GLUT4

modifiziert nach (175)

Die Expression der *insulin-induced-Gene* (*Insig1* und *Insig2*) wird durch verschiedene Effektoren reguliert. Oxysterole neigen dazu, die Expression des *Insig1* zu mindern, während eine erhöhte Expression des *Insig1* bei cholesterinreichen Substanzen vorliegt (176). Ungesättigte Fettsäuren stabilisieren *Insig1* ohne dabei in die Ubiquitinierung einzugreifen (177).

Eine Gewichtszunahme kann Hormone freisetzen, welche die Expression von *Sterol regulatory element-binding protein* (*SREBP*), *Insig1* und *Insig2* hervorrufen (178). Der *SREBP* ist am Cholesterinstoffwechsel beteiligt (Abb. 1.21). Kommt es zu einem Abfall der Cholesterinkonzentration ist *SREBP* in der Lage, andere Gene hoch zu regulieren und damit eine erhöhte Aufnahme als auch Synthese von Cholesterin zu bewirken, um so das Gleichgewicht wieder herzustellen (179). Dazu spaltet der *membrane bound transcription factor protease, site 1* (*MBTPS1*) die *SREBPs* proteolytisch und aktiviert sie so zu Transkriptionsfaktoren. Diese steigern anschließend im Zellkern die Transkriptionsrate mehrerer Gene. Damit kommt es zu einer gesteigerten Cholesterinsynthese und zwar so lange bis Cholesterin sich an *SREBP-cleavage activating protein* (*SCAP*) bindet. Dadurch löst sich der *SCAP-SREBP-Komplex* und die Bildung von Cholesterin wird gehemmt (180). Für *SREBP* werden zwei Isoformen unterschieden, *SREBP1c* ist beteiligt an der Fettsäuresynthese und *SREBP2* hat eine zentrale Rolle im Cholesterinstoffwechsel (180-182).

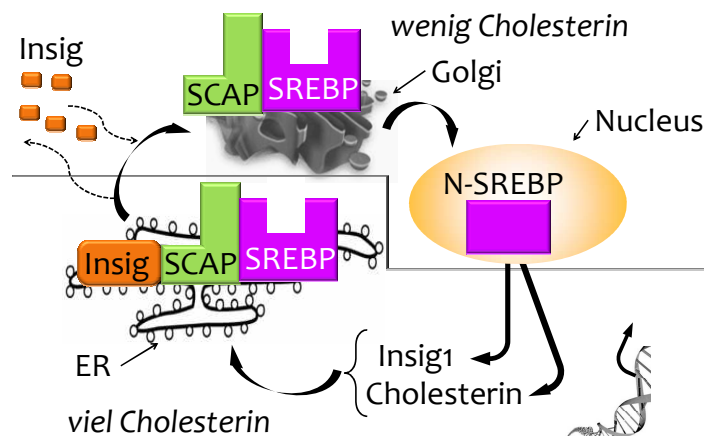


Abb. 1. 21 SREBP Zyklus der Cholesterin-Regulation

Bei hohem Cholesterinspiegel wird SREBP im Endoplasmatischen Retikulum (ER) abgesondert, bildet einen Komplex mit SCAP und ER-verankerten-Insigs. Erst die Bindung von SCAP an Cholesterin ermöglicht die Bindung von SCAP an Insigs. Nach der Abspaltung von Cholesterin trennt sich SCAP ebenfalls von den Insigs. Durch einen vesikulären Transport gelangt der SCAP-SREBP-Komplex in den Golgi-Apparat (Golgi), es folgt eine proteolytische Trennung, SREBP gelangt durch das Zytoplasma in den Kern und aktiviert die Transkription. modifiziert nach (183)

1.6.3 Ausgewählte Gene, die eine Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen

In der dritten Gruppe werden die Gene zusammengefasst, die eine Verbindung zwischen dem MetS und der Östrogendefizienz herstellen (Tab. 1.6).

Der *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (*Pparg*) ist ein Modulator der Leptinproduktion. Es wird angenommen, dass erhöhte Fettsäure-Spiegel bzw. Fettsäure-Metabolite den *Pparg* aktivieren und zur Adipogenese stimulieren (184). Gene, die durch *Pparg* aktiviert werden, stimulieren die Lipidaufnahme der Fettzellen (185). *PPARg* wird hauptsächlich in Fettzellen exprimiert und durch *CCAAT/enhancer-binding-Proteine* (C/EBP) b und d induziert (186,187).

Tab. 1. 5 Gene, die eine Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen, die mittels *real-time* -PCR untersucht wurden

Genname	Gen	Funktion
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma	<i>Pparg</i>	Modulator der Leptin-Produktion
Tumor-Nekrose-Faktor α	<i>Tnfa</i>	Beeinflussung der Insulinsignalwirkung
Interleukin-6	<i>Il6</i>	Glucose- und Lipid- Metabolismus, Korrelation zum BMI
Interleukin-6 Rezeptor	<i>Il6ra</i>	gibt IL6 vermittelte Signale weiter

Ursprünglich ging man davon aus, dass der Tumor-Nekrose-Faktor α (*Tnfa*) primär von Makrophagen exprimiert wird, es konnte aber gezeigt werden, dass *Tnfa* auch in Fettzellen exprimiert wird (166). *Tnfa* reguliert eine Vielzahl von Prozessen in verschiedenen Organen, oft ist ein Synergismus mit Interleukin-6 (*Il6*) zu beobachten. Zu solchen Vorgängen gehört eine erhöhte Insulinresistenz, die durch eine iNOS down-Regulation hervorgerufen wird (188), wie auch eine Minderung des Appetits (167). Östrogen verringert die Expression von *Tnfa* durch eine Blockierung der *Jun* NH₂-terminal kinase (JNK)-Aktivität (189).

Il6 hat ebenfalls Einfluss auf den Glucose- und Lipidmetabolismus, was mit dem Body Maß Index (BMI) korreliert (168). In adipösen Frauen wurde ein erhöhter Serum-IL6-Spiegel festgestellt (190). Erhöhte IL6-Spiegel wiederum sind assoziiert mit *Diabetes mellitus* Typ 2 und KHK (191).

Der Interleukin-6 Rezeptor (*Il6ra*) ist ein Proteinkomplex, der aus einer IL6-Rezeptor-Untereinheit (IL6R) und dem IL6-Signalegeber Gycoprotein (gp) 130 besteht (169). Die Expression des *Il6ra* wird durch Östradiol im Uterus verringert (192).

1.7 Zielstellung der Arbeit

Durch die Deletion des *Cyp19*-Gens, bietet sich mit dem ArKO-Mausmodell die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Östrogendefizienz und der Entwicklung von Symptomen des MetS zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte geprüft werden, inwiefern die ArKO-Maus ein adäquates Modell für Symptome der Wechseljahrsbeschwerden und ihre Behandlung bzw. für wechseljahrsbedingte Adipositas darstellt. Zur Klärung dieser Fragen wurde zusätzlich der Einfluss des Lebensalters der Tiere zu Beginn der Exposition betrachtet. Dem Einfluss dieses Parameters wird gemessen an den Endpunkten in der Literatur bisher wenig Beachtung geschenkt.

Die Bewertung der verschiedenen tierexperimentellen Studien erfolgte anhand der Erfassung der Organgewichte und Plasma-/Serumspiegel sowie die Messung der Regulation der Genexpression. So konnten folgenden Teilziele formuliert werden:

- a) *Vergleichende Analyse unterschiedlicher Modelle von Östrogendefizienz hinsichtlich der Auswirkung einer Östrogenbehandlung.*

Dafür sollten primär die Tiere verglichen werden, die sich im selben östrogenen Status befinden. Als östrogendefiziente Tiere werden definiert die auf genetischem Weg östrogendefizienten ArKO-Mäuse und die chirurgisch erzeugte Östrogendefizienz in kastrierten (ovx) WT-Mäusen, da in diesem Fall beiden Modellen die Östrogenquelle fehlt. Als östrogenisierte Tiere wurden die mit E₂ behandelten ArKO-Mäuse und die intakten WT-Mäuse verglichen. Damit lassen sich zum einen Unterschiede zwischen den beiden östrogendefizienten Modellen beschreiben (ArKO-Maus vs. WT-Maus) wie auch Unterschiede zwischen dem östrogenisierten und östrogen-freien Zustand (ArKO vs. ArKO E₂; ovx WT vs. WT).

- b) *Einfluss des Alters der ArKO-Maus auf Östrogenresponsivität in verschiedenen Organsystemen.*

Es wurde ein Experiment durchgeführt, das klären sollte, welchen Einfluss das Alter weiblicher ArKO-Mäuse auf die Ansprechbarkeit einer Östrogenbehandlung hat. Da sich mit fortschreitendem Alter die Physiologie von Organismen ändert,

sollte geprüft werden, welchen Einfluss das Alter der ArKO-Mäuse zu Beginn des Experimentes auf die erfassten physiologischen und molekularen Parameter nach Östrogenbehandlung hat. Dazu wurden weibliche ArKO-Mäuse aus zwei Altersgruppen verglichen.

- c) *Evaluierung der östrogenen Wirksamkeit von Östrogen und pflanzlicher Sekundärmetabolite mit östrogener Wirksamkeit in der ArKO-Maus.*

Die ArKO-Maus ist ein östrogendefizientes Tier. Damit ist es möglich die Effekte, welche durch eine Behandlung mit dem SERM Raloxifen, dem Soja-Isoflavonoid Genistein, dem Flavonon 8-PN bzw. E_2 ausgelöst werden, vergleichend zu bewerten.

- d) *Bewertung der Behandlungsdauer mit Östrogen bzw. östrogenähnlichen Substanzen für die beobachtete Wirkqualität.*

Es ist bekannt, dass die Ansprechbarkeit von Geweben von der Dauer der Behandlung abhängig ist. Die zeitliche Dauer einer Behandlung mit Östrogen bzw. östrogenähnlichen Substanzen ist eine kritische Determinante für die Wirksamkeit der Behandlung. Deshalb wurde die Effektivität einer Östrogenbehandlung in dem klassischen drei-Tage-Uterotrophen-Assay mit der Effektivität der 21-tägigen Behandlung verglichen.

2. Material

2.1 Verwendete Materialien, Laborgeräte und Lösungen

Tab. 2.1 *Behandlungssubstanzen*

Substanz	Firma	Stadt / Land
Rizinusöl	Roth	Karlsruhe / Deutschland
17β-Estradiol	Sigma-Aldrich	Hamburg / Deutschland
Fulvestrant (ICI 182 780)	Tocris	Bristol / UK
Raloxifen	Alexis-Qbiogene	Grünberg / Deutschland
Genistein	LC Laboratories	Woburn / USA
8-Prenylnaringenin	Synthese im Institut für Biochemie	

Tab. 2.2 *Enzyme und Chemikalien für PCR*

Enzym	Firma	Stadt / Land
DNase I (1000 U)	Promega	Mannheim / Deutschland
MMLV Reverse Transkriptase (50000 Units)	Promega	Mannheim / Deutschland
RNase Out (5000 U)	Invitrogen	Karlsruhe / Deutschland
SYBR®Green I	Sigma-Aldrich	Hamburg / Deutschland
10x PCR Puffer	Invitrogen	Karlsruhe / Deutschland
50mM MgCl ₂	Invitrogen	Karlsruhe / Deutschland
Platinum Taq DNA Polymerase (500 rxn; 5 U/μL)	Invitrogen	Karlsruhe / Deutschland
dNTPs	Invitrogen	Karlsruhe / Deutschland

Tab. 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Stadt / Land
RNAse ExitusPlus™	Applichem	Darmstadt / Deutschland
Agarose	Segetetic	Borken / Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka	Hamburg / Deutschland
Trifast	PeqLab	Erlangen / Deutschland
DMSO	Applichem	Darmstadt / Deutschland

Tab. 2.4 Extraktions- und Analyse-Kits

Kit	Firma	Stadt / Land
RNeasy® Plus	Qiagen	Hilden / Deutschland
RayBio® Mouse Leptin ELISA Kit	RayBiotec	Norcross / USA
QuantiChrom™ Glucose Assay Kit	BioAssay Systems	Hayward / USA

Tab. 2.5 Einweg-Material

Material	Firma	Stadt / Land
96 Well Mikrotiterplatte	VWR	Darmstadt / Deutschland
Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nümbrech / Deutschland
PCR - Platten	BioRad	München / Darmstadt

Tab. 2. 6 Geräte

Laborgeräte	Firma	Stadt / Land
Dismembrator	Sartorius	Göttingen / Deutschland
Homogenisator	Fisher Scientific	Schwerte / Deutschland
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	PeqLab	Erlangen / Deutschland
Elektrophoresekammer	BioRad	München / Deutschland
iCycler	BioRad	München / Deutschland
C1000 Thermal Cycler inkl. CFX96 <i>real-time</i> System	BioRad	München / Deutschland
Plattenphotometer	Tecan	Crailsheim / Deutschland
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg / Deutschland
Wasserbad	VWR	Darmstadt / Deutschland

2.2 Verwendete Pufferlösungen und Reagenzien

Tab. 2. 7 10x PCR-Puffer nach Manatis (193)

	Stammlösung	auf 1mL
500mM KCl	1M	500µL
100mM Tris-HCl (pH 8,3)	1M	100µL
15mM MgCl ₂	1M	1µL
0,1% Gelatine	1%ig	100µL

3. Methoden

3.1 Tierversuche

Für alle durchgeführten Tierversuche lag die Genehmigung für Versuchsvorhaben laut § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vor, ausgestellt durch die Landesdirektion Dresden. Die Tierversuche wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz und den Vorschriften der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Die Züchtung und Tierversuche der Mäuse fanden unter kontrolliert klimatischen Bedingungen von $20 \pm 1^\circ\text{C}$ und 50-80 % Luftfeuchte in der Tierhaltung der Fachrichtung Biologie der Technischen Universität Dresden statt. Die Tiere wurden einem konstanten je zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus ausgesetzt. Während der Züchtungspause und der experimentellen Phase standen den Tieren Futter (Harlan Teklad 2019, Borcheln, Deutschland) und mit HCl ($\text{pH} 3$) versetztes Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung.

Die ersten heterozygoten Elterntiere stellte uns freundlichst Prof. Evan Simpson (Melbourne, Australien) zur Verfügung. Um einen 99,9%igen genetisch einheitlichen Hintergrund sicher zu stellen, wurden diese Tiere mit C57BL/6-Mäusen bis in Generation F10 rückgekreuzt.

3.1.1 Vergleich der östrogenen Empfindlichkeit von Wildtyp- und ArKO-Mäusen (TV 1)

Zur Evaluierung des östrogenen Potentials einer Substanz wird üblicherweise der *in vivo* durchgeführte uterotrophe Assay genutzt. Dieser Assay basiert darauf, dass der Uterus, welcher im natürlichen Zyklus unter östrogenen Kontrolle steht, beim Fehlen der natürlichen Östrogenquelle nach Regression auf ca. 20-25 % seines ursprünglichen Gewichtes sensitiv auf exogen zugeführtes Östrogen reagiert. Die endogene Östrogenquelle wird beim uterotrophen Assay durch Kastration (Ovariectomie) entfernt. Dadurch nimmt bei dem ovariectomierten (ovx) Tier das Uterusfeuchtgewicht stark ab. Die Ovariectomie der Wildtyp (WT)-Mäuse erfolgte am 80. Lebenstag und daran anschließend folgte eine 14tägige Ruhe- und Heilungsphase. Während dieser Phase fand, bedingt durch das Entfernen der Ovarien, eine Hormondeprivation statt. Daran anschließend wurde die subkutane Behandlung mit der Testsubstanz an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt (194).

Zur Beurteilung der Eignung der weiblichen ArKO-Maus als Modell für die Hormonbehandlung klimakterischer Beschwerden, wurde das ArKO-Mausmodell mit dem gängigsten präklinischen Modell für Östrogenmangel dem ovx WT-Mausmodell verglichen.

Hierfür wurden in diesem ersten tierexperimentellen Versuch insgesamt vier Gruppen mit je 7 weiblichen Tieren untersucht (Tab. 3.1). Mit dem 94. Lebenstag begann die Behandlung aller Tiere mit 17 β -Östradiol (E₂) bzw. durch eine Lösungsmittelkontrolle (*vehicle*). Dabei wurde E₂ in DMSO gelöst und anschließend in Rizinusöl aufgenommen. Die Lösungsmittelkontrolle setzte sich aus der errechneten DMSO-Menge, die als Lösungsmittel für die Substanzen der Behandlungsgruppe verwendet wurde, und Rizinusöl zusammen. Bei dem standardisierten Verfahren des uterotrophen Assay wurden den Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 Stunden die Substanzen, wie in Tabelle 3.1 beschrieben, subkutan injiziert.

Tab. 3.1 Behandlungsschema für TV 1

Behandlungsschema TV1. E₂ wurde in einer Dosis von 10 μ g/kg KG/d verabreicht. Die Behandlung mit *vehicle* (Rizinusöl + DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle.

	Östrogen- defizient	Östrogenisiert	Östrogen- defizient	Östrogenisiert
Tiere	WT-Mäuse		ArKO-Mäuse	
Behandlung	ovx, <i>vehicle</i>	<i>vehicle</i>	<i>vehicle</i>	E ₂
Futter	Isoflavonoid-frei			
Behandlungsdauer	3 Tage, subkutan			
Anzahl der Tiere	7	7	7	7

Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Den Tieren wurde Blut entnommen und als Serum und Plasma bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Weiterhin wurden den Tieren der Uterus, das gonadale Fettgewebe wie auch das

infrarenale Fettgewebe und die Leber entnommen, das Gewicht bestimmt (außer gonadales Fettgewebe) und für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Vergleich der Wirksamkeit einer Östrogenbehandlung in Abhängigkeit des Lebensalters der ArKO-Mäuse (TV 2)

Mit fortschreitendem Lebensalter verändern sich Organphysiologie und Stoffwechsel. Durch diese tierexperimentelle Studie sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Alter auf die östrogene Wirksamkeit in der ArKO-Maus hat. Neben 17β -Östradiol wurde auch das in Soja-Isoflavonoiden vorkommende Phytoöstrogen Genistein geprüft.

Für den TV 2 wurden weibliche ArKO-Mäuse im Alter von drei bzw. zwölf Monaten vergleichend untersucht und dabei nach dem standardisierten Verfahren des uterotrophen Assays behandelt (Tab. 3.2). Daran anschließend fand die Organentnahme, wie in Kapitel 3.1.1 bereits beschrieben, statt.

Tab. 3. 2 *Behandlungsschema für TV 2*

Behandlungsschema TV 2. E_2 wurde in einer Dosis von 10 $\mu\text{g/kg KG/d}$ und Genistein mit 15 mg/kg KG/d verabreicht. Die Behandlung mit *vehicle* (Rizinusöl + DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle.

	Kontrollgruppe		Positivkontrolle		Testsubstanz	
Tiere	ArKO-Mäuse					
Alter in Monaten	3	12	3	12	3	12
Behandlung	Lösungsmittel- kontrolle (<i>vehicle</i>)		E ₂		Genistein	
Futter	Isoflavonoid-frei					
Behandlungsdauer	3 Tage, subkutan					
Anzahl der Tiere	10	10	10	10	10	10

3.1.3 Vergleichende Untersuchung von E₂, Raloxifen und pflanzlichen Sekundärmetaboliten im uterotrophen Assay mit ArKO-Mäusen (TV 3)

In der dritten tierexperimentellen Studie wurde die Kurzzeit-Wirkung von E₂, dem SERM Raloxifen und den Phytoöstrogenen Genistein und 8-Prenylnaringenin (8-PN) in der östrogendefizienten ArKO-Maus vergleichend untersucht (Tab. 3.4).

Tab. 3.3 Behandlungsschema für TV3

Behandlungsschema TV 3. E₂ wurde einzeln bzw. auch in der Kombination mit dem Antiöstrogen Fulvestrant (Ful) (1 mg/kg KG/d) in einer Dosis von je 10 µg/kg KG/d verabreicht. Raloxifen (Ral) wurde in einer Dosis von 5 mg/kg/d gegeben. Genistein (Gen) und 8-Prenylnaringenin (8-PN) wurden jeweils mit 15 mg/kg KG/d verabreicht. Die Behandlung mit vehicle (Rizinusöl + DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle.

	Kontrollgruppe	Positivkontrolle	Testsubstanzen
Tiere	ArKO-Mäuse		
Behandlung	Lösungsmittelkontrolle (vehicle)	E ₂	Fulvestrant, E ₂ + Ful, Raloxifen, Genistein, 8-PN
Futter	Isoflavonoid-frei		
Behandlungsdauer	3 Tage, subkutan		
Anzahl der Tiere	7	7	35 (je 7 Tiere)

Die dreitägige subkutane Behandlung begann am 94. Lebenstag, um die Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen tierexperimentellen Studien zu gewährleisten. Dafür wurden weibliche ArKO-Mäuse in 7 Gruppen à 7 Tiere aufgeteilt (Tab.3.3). Durch zervikale Dislokation wurden diese Tiere nach Behandlungsende getötet. Daran anschließend fand die Organentnahme, wie in Kapitel 3.1.1 bereits beschrieben, statt.

3.1.4 Untersuchung von ArKO-Mäusen nach 21tägiger Behandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3)

Mit dieser vierten tierexperimentellen Studie (TV 4) sollte geprüft werden, welchen Einfluss die Dauer der Behandlung auf die Wirksamkeit der Substanzen hat. Den weiblichen ArKO-Mäusen wurden am 94. Lebenstag Siliconpellets SFM1-3050 (Polymer Systems Technology Ltd, High Wycombe, UK) (195) implantiert, die eine kontinuierliche Freisetzung von Substanzen über 21 Tage gewährleisten sollten. Dazu wurden die Pellets zuvor mit der Behandlungssubstanz (Tab. 3.4) manuell befüllt und mit Elastosil® E41 (Wacker, München, Deutschland) verschlossen.

Tab. 3.4 Verwendete Substanzen sowie deren Dosierungen

Substanz	Abkürzung		Dosierung in kg KG/d
Rizinusöl (vehicle treated)	vt	Lösungsmittelkontrolle	TV 1-3: versetzt mit DMSO TV 4: leeres Silicontube
17β-Östradiol	E ₂	Positivkontrolle	10 µg
Fulvestrant (ICI 182 780)	Ful	Antiöstrogen	1 mg
Raloxifen	Ral	selektiver Östrogen Rezeptor Modulator (SERM)	5 mg
Genistein	Gen	Soja- Isoflavonoiden	15 mg
8-Prenylnaringenin	8-PN	Östrogenrezeptor- Agonist	15 mg

Die 21tägige Behandlung mit Hilfe der Siliconpellets, welche in die Unterhaut der ArKO-Mäuse implantiert wurden (Abb. 3.1), begann am 94. Lebenstag.

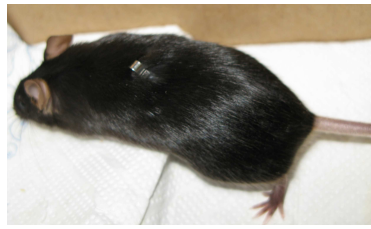


Abb. 3.1 ArKO-Maus nach Pellet-Implantation

Für den TV 4 erfolgte eine Aufteilung der weiblichen ArKO-Mäuse in 7 Gruppen à 7 Tiere (Tab.3.5). Durch zervikale Dislokation wurden diese Tiere nach Behandlungsende getötet. Daran anschließend fand die Organentnahme, wie in Kapitel 3.1.1 bereits beschrieben, statt.

Tab. 3.5 Behandlungsschema für TV 4

Behandlungsschema TV 4. Verwendet wurden weibliche ArKO-Mäuse. E₂ wurde einzeln bzw. auch in der Kombination mit dem Antiöstrogen Fulvestrant (Ful) (1 mg/kg KG/d) in einer Dosis von je 10 µg/kg KG/d verabreicht. Raloxifen (Ral) wurde einzeln und in Kombination mit Ful (1 mg/kg KG/d) in einer Dosis von 5 mg/kg/d gegeben. Genistein (Gen) und 8 Prenylnaringenin (8-PN) wurden jeweils einzeln und in Kombination mit Ful (1 mg/kg KG/d) mit 15 mg/kg KG/d verabreicht. Ein leeres Siliconpellet diente als Negativkontrolle.

	Kontrollgruppe	Positivkontrolle	Testsubstanzen
Tiere	ArKO-Mäuse		
Behandlung	leeres Siliconpellet	E ₂	Ful, E ₂ + Ful, Ral, Ral + Ful, Gen, Gen + Ful, 8 PN, 8-PN + Ful
Futter	Isoflavonoid-frei		
Behandlungsdauer	21 Tage, Unterhautpellet		
Anzahl der Tiere	7	7	56 (je 7 Tiere)

3.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Für die relative quantitative Bestimmung der mRNA-Expression in den untersuchten Organen und Geweben wurde die Gesamt-RNA aus den Organen und Geweben extrahiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um DNA-Kontaminationen zu beseitigen, an dem sich die Reverse Transkription anschloss. Die nun synthetisierte cDNA konnte für die quantitative *real-time*-PCR eingesetzt werden.

3.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels zweier verschiedener Methoden. So wurde die RNA aus der Leber mit Hilfe einer phenolischen Fällung extrahiert und die RNA-Extraktion aus Uterus, infrarenalem und gonadalem Fettgewebe wurden mittels einer Guanidin-Isothiocyanat-Lyse durchgeführt.

Für Uterus und die beiden Fettgewebearten waren die Gewebemengen so gering, dass noch vor der Gesamt-RNA-Extraktion die Organe einer Gruppe vereint (gepoolt) wurden. Das Zusammenführen (poolen) der einzelnen Proben von Leber und gonadalem Fettgewebe fand im Anschluss an die Gesamt-RNA-Extraktion statt. Beim Vereinen der Proben wurde darauf geachtet, dass alle Tiere in einem Pool gleich repräsentiert werden.

3.2.1.1 Extraktion der Gesamt-RNA mittels phenolischer Trennung

Die zelluläre Gesamt-RNA der Leber erfolgte mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (196,197). Dafür wurden 100 mg Leberprobe in ein vorgekühltes Teflongefäß überführt, welches zuvor bei Raumtemperatur mit RNase-ExitusPlus™ behandelt wurde. Diese Behandlung soll eventuellen Kontaminationen durch RNAsen vorbeugen. Mit einer Stahl- oder Wolframkugel in den Teflongefäßen wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Leberproben bei 2000 Schwingungen pro Minute für eine Minute im Dismembrator homogenisiert. Anschließend wurde 1 mL peqGOLD TriFast™ (198) dem Organpulver zugeführt, das Gemisch in ein Eppendorfgefäß überführt und nach dem vom Hersteller bereits etablierten Protokoll weiterverfahren (199). Die RNA wird dabei durch Isopropanol

ausgefällt, zweimal mit eiskaltem 75 % Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) gewaschen und anschließend das getrocknete Pellet in 20-150 µL HPLC-Wasser aufgenommen.

3.2.1.2 Extraktion der Gesamt-RNA mittels Guanidin-Isothiocyanat-Lyse

Die Gesamt-RNA-Extraktion der Uteri und des Fettgewebes wurde mittels Qiagen Kit RNeasy® Plus durchgeführt. Dafür wurden lediglich 30mg Organ/Gewebe eingesetzt. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Kits durchgeführt. Die Gesamt-RNA-Extraktion wurde mittels einer Säulenfällung mit einer Guanidin-Isothiocyanat-Lyse durchgeführt. Dabei wurde die RNA an die Säulenmembran gebunden und im Anschluss mit ca. 50µL Lysis-Puffer eluiert. Dieser Durchfluss wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Lagerung erfolgte grundsätzlich bei -80°C.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität der gelösten Gesamt-RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Nano Drop® 1000. Dies geschah durch eine UV-Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Dazu wurden 2 µL (mindestens aber 1µL) der RNA-Lösung aufgetragen. Das Verhältnis aus den beiden Wellenlängen diente als Nachweis der Reinheit der Proben. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um sicherzustellen, dass die RNA nicht durch RNasen abgebaut wurde. Dafür wurde 1µg RNA auf ein 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Auf dem Gel sollten die rRNA-Banden deutlich sichtbar sein. Die nichtdegradierten RNAs der gleichen Behandlungsgruppe wurden im Anschluss daran gepoolt. Für die einzelnen RNA-Pools wurde die Konzentration erneut photometrisch bestimmt und anschließend die Qualität der RNA über ein Ethidiumbromid-Agarosegel erneut kontrolliert. Mittels der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Integrität der RNA untersucht.

3.2.3 DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen

Vor der cDNA-Synthese ist ein DNase-Verdau notwendig. Er sorgt für den enzymatischen Abbau residualer genomischer und mitochondrialer DNA, da diese die

Genexpressionsanalyse stören würden. Der Verdau wurde nach dem Protokoll von Maniatis *et al.* durchgeführt (193). In Tabelle 3.6 ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes dargestellt.

Für den Verdau wurden je 3 µL RNA des Pools mit DNase I und RNase Out für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µL 25mM EDTA und eines Denaturierungsschrittes von 5 min bei 80 °C abgestoppt. Durch eine sich anschließende PCR mit Primern des Referenzgen *Rps18* (Ribosomales Protein) (Tab.1.4 - 1.6) wurde eine Kontrolle des Verdau durchgeführt. Dazu diente 1 µL der verdauten RNA als Template für die PCR. Als Positivkontrolle wurde 1 µL einer beliebigen bereits getesteten Maus-cDNA verwendet. Nach erfolgreichem Verlauf der Test-PCR (Tab. 3.12) sollte lediglich die Positivkontrolle eine Amplifikation und den passenden Schmelzpunkt aufweisen.

Tab. 3.6 Zusammensetzung eines DNase -Verdau nach Maniatis (193)

Komponente	Menge
Gesamt- RNA	3 µg
10x PCR-Puffer (Maniatis) (Tab. 2.7)	1 µL
RNase OUT (Invitrogen)	0,5 µL
DNase (Promega 1U/µl))	0,5 µL
HPLC- H ₂ O	ad 10 µL

3.2.4 Synthese der cDNA

Wie schon der DNase-Verdau so erfolgte auch die Synthese der *first-strand* cDNA nach dem Protokoll von Maniatis *et al.* (193). Mit Hilfe von Oligo-dT-Primern und der MMLV Reversen Transkriptase (Promega, Mannheim, Deutschland) wird die RNA in cDNA umgeschrieben. In Tabelle 3.7 kann die Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Reaktionsansatzes entnommen werden. Zur Beseitigung der Sekundärstruktur der RNA wurde der Ansatz aus Tabelle 3.6 mit dem Komponentenmix Tabelle 3.7 versetzt. Für die Synthese der cDNA wurde die RNA des Ansatzes aus Tabelle

3.6 mit dem Komponentenmix aus den Schritten 1-3 (Tab 3.7) für 5 min bei 65°C erhitzt (Schritt 4, Tab. 3.7). Beim anschließenden Abkühlen auf Eis hybridisieren die Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer an die Poly-Adenin-Schwänze der mRNA (Schritt 5, Tab. 3.7).

Tab. 3.7 Zusammensetzung und Ablauf eines für die cDNA-Synthese Ansatzes

Schritt	Komponente	Volumen
1	RNA aus DNase-Verdau	3 µg
2	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ -Primer (100 µM)	1 µL
3	dNTP Mix (10mM)	1 µL
4	<i>Inkubation für 5 min bei 65 °C</i>	
5	<i>langsam auf Eis abkühlen lassen (ca. 2 min)</i>	
6	5x first-strand Puffer	4 µl
7	DTT (0,1 M)	2 µL
8	RNaseOut	1 µL
9	<i>Inkubation für 2 min bei 42 °C</i>	
10	reverse Transkriptase:	1 µL
11	<i>Inkubation für 50 min bei 42 °C</i> <i>Denaturierung für 15 min bei 70 °C</i>	

Die Komponentenmischung aus den Schritten 6-8 (Tab.3.7) wird dem RNA-Mix hinzu pipettiert und mit der Pipette leicht durchmischt. Für 2 min wurde bei 42 °C der Ansatz vortemperiert und anschließend mit 1 µL der reversen Transkriptase versetzt (Schritt 10, Tab. 3.7). Diese transkribiert, wie in Schritt 11 (Tab. 3.7) beschrieben, bei 42 °C für 50 min die mRNA in cDNA, um danach für 15 min bei 70°C erhitzt zu werden, damit sie denaturiert wird. Anschließend wurde die cDNA mit HPLC-Wasser 1:3 verdünnt und mittels einer qPCR kontrolliert. War die Kontroll-PCR erfolgreich, das heißt alle entstandenen cDNAs wiesen

eine Amplifikation, den annähernd gleichen c_t -Wert und den passenden Schmelzpunkt auf, fanden sie für die Genexpressionsanalyse Verwendung.

3.3 qPCR-quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine „Methode zur Herstellung zahlreicher Kopien eines DNA Moleküls durch enzymatische Vervielfältigung einer ausgewählten Sequenz“ (200). Die qPCR im speziellen ist eine quantitative Methode beispielsweise zur vergleichenden Quantifizierung von mRNA-Spiegel untersuchter Gene. Hierbei macht man sich die Annahme zunutze, dass eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit zwischen der Ausgangskonzentration einer cDNA und der notwendigen Anzahl von Amplifikationszyklen des Schwellenwertes der PCR-Produktmenge (dem sogenannten c_t -Wert) vorliegt. Dadurch kann eine Quantifizierung der cDNA relativ zu einer Referenzprobe durchgeführt werden.

3.3.1 Primer-Design

Zur Erstellung der Primersequenzen wurden die im Labor bereits etablierten Parameter, wie in Tab 3.8 dargestellt, angewendet.

Tab. 3. 8 *Parameter des Primerdesign mittels Primer3 (201)*

Parameter	Wert
Produktlänge (Amplikon)	150-250 bp
Primerlänge	20-24 bp
Annealingtemperatur	56-58 °C
GC-Gehalt	20-80 %
Max. Self Complementarity	2-3
Max. 3' Self Complementarity	2-4
GC-Klammer (am 3' Ende der Sequenz)	1

Das Erstellen der Primer erfolgte nach den vorgestellten Kriterien des Primerdesigns. So wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare Exon übergreifend liegen und keine sogenannten Haarnadelstrukturen bilden. Zur Vermeidung etwaiger Bildung von Dimeren (Homo- oder Heterodimeren) bzw. von Sekundärstrukturen wurde der Oligo Analyzer 3.1 (202) verwendet (203,204).

Tab. 3. 9 *Verwendete Primer für die qPCR, einschließlich der Amplikongröße*

Gen	Sequenz		Produktgröße (bp)
	sense primer (5'–3')	antisense primer (5'–3')	
<i>Esr1</i>	TGT TTG CTC CTA ACT TGC TCC C	GGT GGA TGT GGT CCT TCT CTT	222
<i>Esr2</i>	GCC AGG AAG CAG AGA GTA GC	TCA TGC TGA GCA GAT GTT CC	189
<i>Pgr</i>	CTG GCA TGG TCC TTG GAG	TGG AAG TGT CAG GCT TTG TG	246
<i>Ltf</i>	GCA AAA CCA CAT CGG AGA AG	GGG AGT GAG GAG ACC AGA TG	204
<i>Clu</i>	GAT TCC CTC CCA GAC ACT CC	GTG TCA CTG AGG TGG TGG TG	196
<i>Lep</i>	AGA TCC CAG GGA GGA AAA TG	TGA AGC CCA GGA ATG AAG TC	217
<i>Lepr</i>	TCG ACA AGC AGC AGA ATG AC	CTT GTG CCC AGG AAC AAT TC	159
<i>Insr</i>	GAA TGT GGG GAT GTC TGT CC	ATC AGG TTC CGA ACA GTT GC	201
<i>Insig1</i>	GTA CAC GTC CCC TGA TTT CC	CCA CTC TGA ACC ATG TGC TG	154
<i>Insig2</i>	GAG GCA TAA CGA TGG GAA AC	CAA GGG AAA ACT GGG TCC TC	174
<i>Glut 4</i>	GCT TTG TGG CCT TCT TTG AG	CGG CAA ATAG AAG GAA GAC G	195
<i>Srebp</i>	GAT CGC AGT CTG AGG AGG AG	GAT CGC CAA GCT TCT CTA CG	202
<i>Pparg</i>	TCA TGA CCA GGG AGT TCC TC	CAG GTT GTC TTG GAT GTC CTC	200
<i>Tnfa</i>	GGC CTC CCT CTC ATC AGT TC	GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC	178
<i>Il6</i>	TGA ACA ACG ATG ATG CAC TTG	CTC TGA AGG ACT CTG GCT TTG	264
<i>Il6ra</i>	TTC CTG GTA GCT GGA GGA AG	TGA GGA GAG GAA CCA GAA GG	326
<i>Rps18</i>	AGG ATG TGA AGG ATG GGA AG	TTG GAT ACA CCC ACA GTT CG	187

Alle Primer (Tab.3.9), die für die PCR Anwendung fanden, wurden mittels der Software *Primer3* (201) erstellt (203,204).

3.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Quantifizierung der cDNA durch die PCR ist ein effizienter Verlauf der qPCR Grundvoraussetzung, da sonst falsche Ergebnisse auftreten können. Aus diesem Grund musste das optimale Verhältnis von Primermenge und MgCl_2 -Konzentration für jedes Primerpaar ermittelt werden. Hierfür wurde eine Matrix aus PCR-Ansätzen vorbereitet und die Menge an Primer und MgCl_2 wie in Tabelle 3.10 variiert.

Tab. 3. 10 *Matrix zur Primeroptimierung*

MgCl_2	2mM	3mM	4mM	5mM
Primer-Konzentration	0,1 μM			
	0,2 μM			
	0,3 μM			
	0,4 μM			

Aus den PCR-Läufen wurde die effizienteste Primer- MgCl_2 -Kombination ausgewählt und mittels Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel auf die richtige Produktgröße überprüft.

In Tabelle 3.11 sind die final verwendeten Volumina der Primer sowie des MgCl_2 für die jeweils untersuchten Gene dargestellt.

Tab. 3. 11 Verwendete Volumina für MgCl₂ und Primer
Alle Werte sind in µL angegeben.

Gen	MgCl ₂	Primer	MgCl ₂	Primer	Gen	MgCl ₂	Primer	MgCl ₂	Primer
	iCycler		cfx 96			iCycler		cfx 96	
<i>Rps18</i>	3	1,5	1,5	0,75	<i>Srebp</i>	-	-	1	0,75
<i>Esr1</i>	5	2	2,5	1	<i>Insig1</i>	-	-	1,5	0,75
<i>Esr2</i>	5	1,5	2,5	0,75	<i>Insig2</i>	-	-	1	0,75
<i>Clu</i>	3	1	1,5	0,5	<i>Pparg</i>	3	1,5	1,5	0,75
<i>LTF</i>	2	1,5	1	0,75	<i>Tnfa</i>	3	1,5	1,5	0,75
<i>Pgr</i>	2	1,5	1	0,75	<i>Glut4</i>	-	-	1,5	0,75
<i>Lep</i>	4	1,5	2	0,75	<i>Il6</i>	5	1,5	2,5	0,75
<i>Lepr</i>	3	1	2	0,5	<i>Il6ra</i>	3	1,5	1,5	0,75
<i>Insr</i>	2	1,5	2	0,75					

3.3.3 Bestimmung der PCR – Effizienz

Eine hohe Amplifikationseffizienz der zu untersuchenden Primerpaare ist für eine zuverlässige relative Quantifizierung essentiell. Zur Effizienzbestimmung eines Primerpaares wurde das PCR-Produkt der Optimierungs-PCR (Kapitel 3.3.2) mehrfach 1:10 verdünnt. Die PCR-Reaktionen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und die ermittelten c_t -Werte als Basis für die Bestimmung der PCR-Effizienz verwendet. Dazu wurden sie für die Auswertung in einem logarithmischen Diagramm gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen, anschließend wurde eine Regressionsgerade durch die ermittelten Punkte gelegt. Mittels der Steigung jener Gerade konnte die Effizienz der PCR-Reaktion ermittelt werden (205). Betrug die Effizienz $\geq 90\%$, fand das Primerpaar für die qPCR Verwendung.

3.3.4 Die quantitative *real-time*-PCR

Für die qPCR wurden drei voneinander unabhängig cDNAs synthetisiert, um anschließend drei unabhängige Quantifizierungen mit Triplikaten durchführen zu können.

Tab. 3. 12 Pipettierschema eines qPCR-Ansatzes

Komponente	Finale Konzentration	Volumen iCycler (BioRad)	Volumen cfx 96 (BioRad)
10x PCR-Puffer (incl. SYBR [®] Green I)		5 µL	2,5 µL
Kalibrierungslösung 2	10 nM	1,25 µL	-
dNTPs (2,5mM)	je 0,2 mM	4 µL	2 µL
MgCl ₂ (50mM)	2-5 mM	2-5 µL	1-2,5 µL
Primer	0,1-0,4 µM	1-1,5 µL	0,5-1 µL
cDNA		1 µL	1 µL
Platinum [®] Taq DNA Polymerase	0,75 U	0,15 µL	0,075 µL
HPLC-H ₂ O		ad 50 µL	ad 25 µL

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt. Für die Detektion der Amplifikate wurde SYBR[®]Green I (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) verwendet (206). SYBR[®]Green I ist ein interkalierender Cyanin-Farbstoff, welcher unspezifisch an die doppelsträngige DNA bindet, wodurch seine Fluoreszenz deutlich ansteigt. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert folglich mit der Zunahme der Menge an doppelsträngigen DNA. Diese Reaktion kann unspezifisch verlaufen, allerdings lassen sich die spezifischen PCR-Produkte von den unspezifischen Primerdimeren aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen unterscheiden (Kapitel 3.3.4.1), weshalb jedem PCR-Lauf eine Schmelzpunktanalyse angeschlossen wurde. Im Kapitel 3.3 wurde schon angemerkt, dass für die qPCR das für das Ribosomale Protein S18 (*Rps18*) kodierende Gen als Referenzgen

verwendet wurde. Alle qPCR-Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Die in Tabelle 3.12 angegebenen Komponenten geben einen PCR-Reaktionsansatz wider.

Tab. 3. 13 *PCR-Verlauf*

Komponente	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Hitzeaktivierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	\
Annealing	55 °C	10 sec	45x
Elongation	72 °C	20 sec	/
Datensammlung und <i>real-time</i> Analyse aktiviert			
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Schmelzkurve	von 60 °C –95 °C um je 0,5 °C für je 5 sec		

Um die untersuchten Gene vergleichend auswerten zu können, müssen die PCR-Ansätze idealerweise gleichzeitig in einem Thermocycler laufen. Darum wurde bei der Auswahl der Primerpaare darauf geachtet, dass sich die Annealingtemperaturen möglichst ähnlich sind (vergleiche Tab. 3.8.). Für die PCRs der mRNA aus den Gewebeproben der tierexperimentellen Studien TV 1 und TV 2 wurde der iCycler verwendet. Die Analysen zu den Tierexperimenten TV 3 und TV 4 wurden in einem C1000 Thermal Cycler mit CFX96 *real-time* System durchgeführt. Das Protokoll der Messung in beiden PCR-Geräte bestand aus den in Tabelle 3.13 dargestellten Schritten.

Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die qPCR fand eine Schmelzkurvenanalyse statt (Tab. 3.12). Mit ihr ist es möglich, die Spezifität und die Reinheit der PCR-Produkte zu ermitteln. Dadurch entfällt die Durchführung einer Gelelektrophorese, einschließlich densometrischer Analyse.

Die DNA Produkte werden durch den kontinuierlichen Temperaturanstieg von 0,5 Gradschritten, beginnend bei 60 °C, aufgeschmolzen. Die Temperatur wird für je

5 Sekunden gehalten bis 95 °C erreicht sind. Bei jedem Temperaturschritt wird die Fluoreszenzintensität bei 490 nm gemessen, welche mit der Temperaturerhöhung schrittweise abnimmt, da das interkalierende SYBR®Green I freigesetzt wird. Der produktspezifische Schmelzpunkt (T_m) ist erreicht, wenn die doppelsträngigen Amplikons zu Einzelsträngen schmelzen. Bei diesem Schritt kommt es zu einem abrupten Freisetzen von SYBR®Green I und dadurch zu einem Absinken der Fluoreszenz. Das PCR-Programm stellt dies in einem Diagramm dar, in dem es die negative Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur ($-dF/dT$) aufträgt. Dies führt dann zur Darstellung des T_m . Der T_m ist für jedes Amplikon spezifisch und hängt vom GC-Gehalt als auch von der Fragmentlänge der DNA-Sequenz ab.

3.3.5 Auswertung der quantitativen *real-time* PCR

Für die Auswertung der qRT-PCR fand die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode nach Paffl *et al.* Verwendung (205). Mit Hilfe dieser Methode werden die relativen mRNA-Mengen der untersuchten Zielgene gegen die mRNA-Menge des Referenzgenes berechnet. Grundvoraussetzung für diese Methode ist eine PCR-Effizienz der Primer von etwa 100%, dies entspricht einer Verdopplung des Amplikons pro PCR-Zyklus. Aus den C_t -Werten der Triplikate wurde der Mittelwert gebildet. Der Berechnung der relativen Expression (RE) lag folgende Formel zu Grunde:

$$RE = 2^{-(\Delta C_t \text{ Zielgen} - \Delta C_t \text{ Referenzgen})}$$

Dabei ist

$$\Delta C_t \text{ Zielgen} = C_t \text{ Zielgen (Probe)} - C_t \text{ Zielgen (Kontrolle)}$$

und

$$\Delta C_t \text{ Referenzgen} = C_t \text{ Referenzgen (Probe)} - C_t \text{ Referenzgen (Kontrolle)}$$

Als Kontrolle dienten in TV 1 und TV 2 die östrogendefizienten Tiere, während es in TV 3 die mit Rizinusöl und DMSO behandelten Tiere waren und TV 4 die Tiere mit dem leeren Silikonpellet. Jede PCR wurde mindestens dreimal mit jeweils unabhängig hergestellten cDNAs durchgeführt.

In den TV 1 und TV 2 wurde neben der relativen Expression auch die Expression $2^{-\Delta ct}$ berechnet. Dafür lag folgende Formel zu Grunde:

$$\Delta c_t = c_t \text{ Zielgen} - c_t \text{ Referenzgen}$$

3.4 Biochemische Parameter

Für die Bestimmung des Leptin-Spiegels im Blutserum (Serumleptin-Spiegel) und des Glukosespiegels im Blutplasma (Plasmaglukose-Spiegel) wurde den Tieren nach der Tötung Blut entnommen. Das Blut kam je zur Hälfte in ein Reaktionsgefäß, welches mit 3,6 % Natriumcitrat versehen war bzw. Natriumcitrat-frei war. Nach einem dreiminütigen Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm war das Blut in dem mit Citrat versetzten Reaktionsgefäß in die Bestandteile Plasma und Blutzellen sichtbar getrennt. In diesem Fall wurde das Plasma abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In dem Natriumcitrat-freien Reaktionsgefäß konnte nach dem Zentrifugationsschritt das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

Plasma und Serum wurden anschließend mit käuflich erwerblichen Reaktionskits auf ihren Serumleptin- als auch auf ihren Plasmaglukose-Gehalt untersucht.

3.4.1 Serumleptin-Spiegel

Der Serumleptin-Spiegel wurde mit dem RayBio[®] Mouse-Leptin ELISA Kit bestimmt. Dieser *in vitro* Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) dient speziell der quantitativen Messung von Maus-Serumleptin. Er basiert auf einem Antikörper, welcher speziell mit Maus-Serumleptin reagiert.

Dabei ist eine 96-Well-Microtiterplatte mit diesem speziellen Antikörper beschichtet. Die Standards (0-200 pg/mL Leptin) und Proben wurden als Duplikate in die Wells dieser Platte pipettiert. Befindet sich Leptin in der Probe, so bindet es an die immobilisierten Antikörper. Nach einem anschließenden Waschschrift wurde der biotinylierte Anti-Maus-Leptin-Antikörper angeheftet und nach einem weiteren Waschschrift wurde das ungebundene biotinylierte HRP (*horseradish*-Peroxidase)-konjugierte Streptavidin in

die Wells hinzu pipettiert. Die Wells wurden erneut mit einem Waschpuffer gespült, um anschließend mit einer TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-Substrat-Lösung aufgefüllt zu werden. Befindet sich gebundenes Leptin in dem Well der 96-Well-Platte, kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbinintensität wurde anschließend bei 450 nm an einem Plattenphotometer ausgelesen.

Zur Auswertung wurden der Mittelwert aus den Duplikaten der Standards und der Proben erhoben. Anhand der Standardwerte konnte anschließend mit Hilfe der Sigma Plot 9 Software (SYSTAT, Ekrath, Deutschland) eine Standardkurve auf log-log Basis erstellt werden.

3.4.2 PlasmaglucoSe-Spiegel

Für die Bestimmung des PlasmaglucoSe-Spiegels wurde der QuantiChrom™ Glucose Assay Kit verwendet. Basierend auf der Grundlage, dass Glucose ($C_6H_{12}O_6$) mit dem o-Toluidin eine spezielle Farbreaktion auslöst, kann diese dann mit Hilfe eines Plattenphotometers ausgelesen werden.

Dafür wurde in Reaktionsgefäßen ein vom Hersteller geforderter Standard im Bereich von 0-300 mg/dL Glucose hergestellt und die Proben mit einer o-Toluidin-haltigen Reagenz versetzt. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate geführt. Nach einem erfolgten Hitzeschritt, in kochendem Wasser für acht Minuten, wurden die Standards und die Proben in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt, um so mit dem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 630 nm ausgelesen zu werden.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung fand das Programm Office Excel 2003 der Firma Microsoft® Verwendung. Die dargestellten Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung angegeben. Lediglich die Ergebnisse der Körpergewichte sowie der Feuchtgewichte der Uteri, des infrarenalen und des gonadalen Fettgewebes wurden mittels Boxplot dargestellt. Wie bei solchen Abbildungen ebenfalls üblich, wurden der Median, die 10% und 90% Perzentile sowie die Minimal- und Maximalwerte dargestellt. Wo es die Datenmenge (ab 5 Datenpunkten) zuließ, wurde ein Ausreißertest

nach Grubbs vor jeder Analyse durchgeführt (207). Voraussetzung für den Grubbs-Test ist, dass die Daten annähernd normal verteilt sind und die somit ermittelten Ausreißer aus einer Stichprobengruppe aus den folgenden Analysen herausgenommen werden konnten.

Als eine Möglichkeit zur Bestimmung von Signifikanzen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mittels ANOVA-Test durchgeführt. Dazu ist direkt im Anschluss ein sogenannter *post-hoc*-Test nötig. In diesem Fall wurde der *post-hoc*-Test nach dem Bonferroni-Verfahren durchgeführt, um die Gruppen zu ermitteln, deren Ergebnis sich signifikant unterscheiden. Diese statistische Auswertungsmethode wurde zur Evaluierung der Daten der Körpergewichte, der Feuchtgewichte der Uteri, des infrarenalen Fettgewebes sowie des Serumleptin-Spiegels und des Plasmaglukose-Spiegels angewendet. Das Signifikanzniveau wurde hierfür wie folgt festgelegt:

$p \leq 0,05$	*	/ #	leicht signifikant
$p \leq 0,01$	**	/ ##	signifikant
$p \leq 0,001$	***	/ ###	hoch signifikant

Zur Evaluierung der Daten aus den Genexpressionsanalysen fand der Welch-t-Test Verwendung (208). Hierbei handelt es sich um einen parametrischen Test für zwei normalverteilte Stichproben mit unterschiedlichen Varianzen. Aufgrund geringer Organmengen, aus Praktikabilitäts- und Kostengründen, wurde die RNA der einzelnen Tiere einer Behandlungsgruppe gepoolt. Daher zeigt die statistische Auswertung der Daten lediglich die Genauigkeit bzw. die Unterschiede in den einzelnen PCRs und nicht die Unterschiede der einzelnen Tiere. Das Signifikanzniveau wurde in diesem Fall auf

$p \leq 0,05$	*	/ #	signifikant
---------------	---	-----	-------------

festgelegt.

4. Ergebnisse

Mit Hilfe der tierexperimentellen Studien TV 1 und TV 2 wurden jeweils zwei Mausmodelle verglichen und auf ihre östrogene Wirkung geprüft. In TV 1 wurde eine vergleichende Analyse unterschiedlicher Modelle der Östrogendefizienz hinsichtlich der Auswirkung einer Östrogenbehandlung durchgeführt. Dazu kam es zu einem Vergleich der genetisch östrogendefizienten ArKO-Mäuse mit den chirurgisch östrogendefizienten ovx WT-Wurfgeschwister. Anhand des TV 2 sollte geprüft werden, welchen Einfluss das Lebensalter der ArKO-Mäuse zu Beginn des Experiments auf die Östrogenresponsivität in verschiedenen Organsystemen hat. Hierfür wurden die erfassten physiologischen und molekularen Parameter nach östrogener Behandlung von ArKO-Mäusen aus zwei Altersgruppen verglichen.

Mittels der tierexperimentellen Studien TV 3 und TV 4 sollte zum einen die östrogene Wirksamkeit von E₂ und pflanzlichen Sekundärmetaboliten mit östrogener Wirkqualität in der östrogendefizienten ArKO-Maus geprüft werden. Zum anderen sollte die Dauer der Behandlung mit E₂ bzw. östrogenen Substanzen wie Raloxifen, Genistein und 8-PN, für die beobachtete Wirkqualität bewertet werden.

Neben den physiologischen und biochemischen Parametern wurde auch die Regulation der Genexpression untersucht. Dabei wurden die Zielgene in Gruppen eingeteilt, die im Zusammenhang mit östrogener Responsivität stehen bzw. Verbindungen zum MetS aufweisen (Tab. 1.4 - 1.6). Die in den Experimenten zur Analyse verwendeten Primer sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

4.1 Vergleich der E₂-Responsivität von WT- und ArKO-Mäusen mit Bezug zum MetS und menopausalen Symptomen (TV 1)

In Veröffentlichungen wurde die Theorie aufgestellt, dass die ArKO-Maus ein adäquates Tiermodell zur Erforschung für die Behandlung der Folge, einer lebenslangen Östrogendefizienz darstellt (209–211). Der Zustand der Östrogendefizienz findet sich auch in postmenopausalen Frauen wider. Während bei der Frau aufgrund der nachlassenden endokrinen Funktion der Ovarien die E₂-Produktion verringert wird und so in einen östrogendefizienten Zustand kommt, weist die ArKO-Maus durch die Deletion des

Cyp19-Genes einen Östrogenmangel auf. Als Folge wird für die ArKO-Maus eine massive Zunahme des Fettgewebes beschrieben (116). Diese phänotypischen Veränderungen werden generell dem Östrogenmangel zugeschrieben und wurden auch in ovx Tieren beobachtet.

Es besteht somit die Möglichkeit, ein neues Modell zu etablieren, welches bei der Klärung von Fragen, die Östrogendefizienz betreffend, Aufschluss geben könnte. Bisher wird für die Beantwortung als Modell für Östrogendefizienz hauptsächlich die ovx Ratte, seltener auch die ovx Maus, als experimentelles Modell herangezogen.

4.1.1 Vergleichende funktionelle Prüfung in einem genetischen und einem chirurgischen Modell der Östrogendefizienz

Um die ArKO-Maus vergleichend mit WT-Mäusen hinsichtlich der östrogenen Responsivität zu charakterisieren, wurde eine Gruppe 80-Tage alter WT-Mäuse einer Kastration (ovx) unterzogen. Mit der Behandlung aller Gruppen gemäß Tabelle 3.1. wurde am 94. Lebenstag begonnen. Neben verschiedenen physiologischen und biochemischen wurden auch auf molekularer Ebene die Regulation der Genexpression bestimmt und ausgewertet.

4.1.1.1 Einfluss der Östrogendefizienz auf das Körpergewicht

Nach Beendigung der Behandlung konnte gezeigt werden, dass zwischen den vergleichbaren östrogendefizienten Gruppen ovx WT-Mäuse und Lösungsmittel behandelten (vt) ArKO-Mäusen ein signifikanter Unterschied des Körpergewichtes besteht (Abb. 4.1).

Dabei sind die vt ArKO-Mäuse signifikant um das 1,3-fache schwerer als die ovx WT-Tiere. Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied zwischen intakten vt WT und E₂-substituierten ArKO-Mäusen dahingehend beobachtet werden, dass die E₂-substituierten ArKO-Mäuse ein um das 1,1-fache signifikant schwereres Körpergewicht aufweisen als die intakten WT-Mäuse.

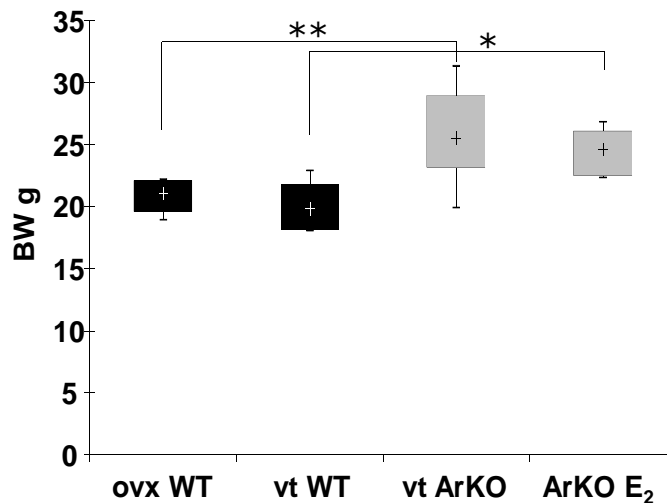


Abb. 4.1 Körpergewicht (BW)

Dargestellt ist das Körpergewicht von WT- und ArKO-Mäusen infolge einer subkutanen Applikation von vehicle bzw. E₂ während eines uterotrophen Assay. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte.

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01

4.1.1.2 Einfluss der Östrogendefizienz auf das Uterusfeuchtgewicht

Um einen Einfluss von E₂ auf das Wachstum des Uterus nachzuweisen, wurde das Gewicht der Uteri bestimmt (Abb. 4.2). Der Uterus, welcher ein „klassisches“ Zielorgan für exogenes und endogenes Östrogen ist, sollte unter Östrogeneinfluss eine Erhöhung im Feuchtgewicht aufweisen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu anderen Experimenten zu gewährleisten, wurden alle Organgewichte auf das Körpergewicht (g/kg) normalisiert. Auf die Darstellung der Absolutgewichte wurde verzichtet.

Abbildung 4.2 zeigt die Einflüsse der beiden unterschiedlichen Modelle der Östrogendefizienz in Mausmodelle auf den Uterus (ovx WT-Maus und vt ArKO-Maus) und den Einfluss der Präsenz von Östrogenen (vt WT-Maus und ArKO E₂). Die physiologisch vergleichbaren Gruppen ovx WT und vt ArKO unterscheiden sich signifikant. Die Uteri der vt ArKO-Mäuse sind dabei signifikant um das 3-fache leichter verglichen mit denen der WT-Mäuse. Dass endogenes Östrogen einen Einfluss auf das Uterusgewicht hat, zeigt der signifikante Unterschied, der innerhalb der WT-Gruppen vorliegt. Hier waren die Uteri der unter Östrogeneinfluss (vt WT) stehenden Tiere signifikant um das 6-fache schwerer als bei den Tieren unter Östrogendeprivation (ovx WT). Ebenso zeigt sich ein signifikanter

Unterschied innerhalb der ArKO-Gruppen. In diesem Fall sind ebenfalls die Uteri der mit E₂ behandelten Tiere (ArKO E₂) signifikant um das 3-fache schwerer als die der unbehandelten Tiere (vt ArKO).

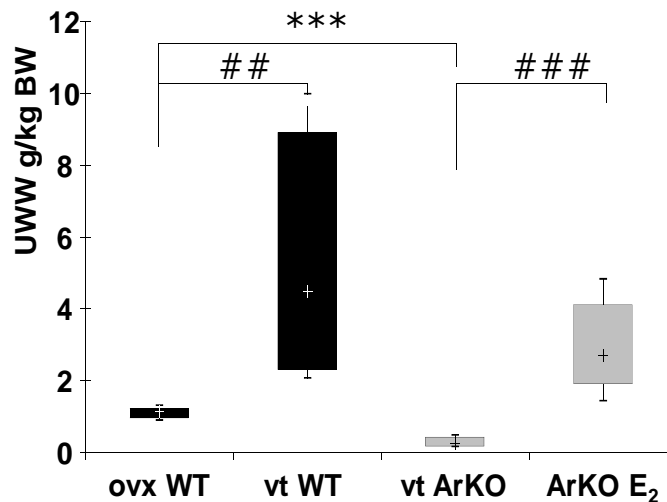


Abb. 4.2 Uterusfeuchtgewicht (UWW)

Dargestellt ist das Uterusfeuchtgewicht von WT- und ArKO-Mäusen nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 1. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte.

*** $p \leq 0,001$ ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$

4.1.1.3 Einfluss der Östrogendefizienz auf den Serumleptin-Spiegel

Signifikante Unterschiede im Serumleptin-Spiegel zwischen ArKO-Mäusen und WT-Mäusen wurden bereits in der Literatur beschrieben (115). So ist der Serumleptin-Spiegel in der vorliegenden Untersuchung bei den ArKO-Mäusen signifikant um das 2-fache höher als bei den vergleichbaren Gruppen der WT-Mäuse (Abb. 4.3). Im Vergleich der beiden Modelle treten keine signifikanten Unterschiede auf.

Es ist allerdings ein Trend dahingehend erkennbar, dass die östrogendefizienten Tiere einen niedrigeren Serumleptin-Spiegel haben als die unter Östrogeneinfluss stehenden Mäuse.

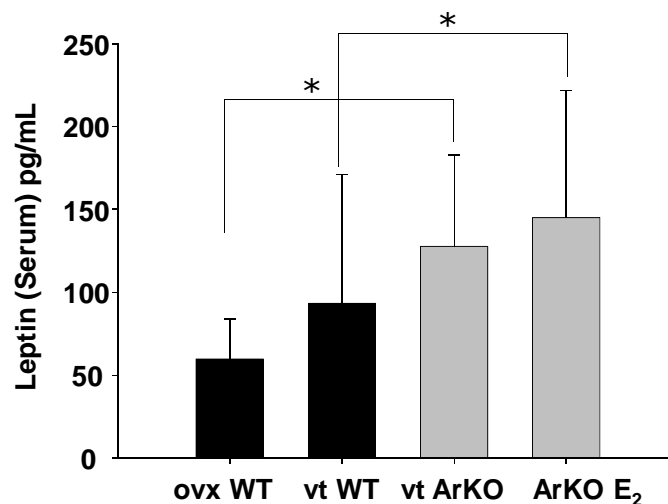


Abb. 4.3 Serumleptin-Konzentration in pg/mL

Dargestellt ist die Serumleptin-Konzentration in pg/mL von WT- und ArKO-Mäusen nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 1. *p ≤ 0,05

4.1.1.4 Einfluss der Östrogendefizienz auf den Plasmaglucoese-Spiegel

Bei der Bestimmung des Plasmaglucoese-Spiegels wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem WT-Mausmodell und dem ArKO-Mausmodell beobachtet. Es fällt allerdings auf, dass ein Trend vorhanden ist, bei dem die ArKO-Mäuse einen geringeren Plasmaglucoese-Spiegel aufweisen im Vergleich zu den WT-Mäusen (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Einfluss der Östrogendefizienz auf die Genexpression

Um mögliche molekulare Mechanismen, die den beobachteten physiologischen und biochemischen Unterschieden zu Grunde liegen, aufzudecken und weiter zu charakterisieren, wurde das mRNA-Expressionsmuster von östrogensensitiven Markergenen, von Genen, die mit dem Metabolisches Syndrom (MetS) verknüpft sind und von Genen, die eine mögliche molekulare Verbindung zwischen dem MetS und Östrogendefizienz darstellen, untersucht.

In den folgenden Abschnitten sind die Abbildungen wie folgt aufgebaut: Im linken Abbildungsteil (Teil A) ist der mRNA-Spiegel ($2^{-\Delta Ct}$) dargestellt. Dabei sind die Werte gegen das Housekeeping-Gen *Rps18* normalisiert worden. Dieser Teil stellt somit die

Unterschiede zwischen den jeweiligen östrogendefizienten Bezugsgruppen ovx WT und vt ArKO dar. Im rechten Teil der Abbildung (Teil B) wird die Genexpression von vt WT und ArKO E₂ Mäusen im Bezug zu der jeweiligen östrogendefizienten Gruppen ovx WT und vt ArKO gezeigt ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).

4.1.2.1 Uterus

Östrogen vermittelt proliferative Reaktionen auf den Uterus über zwei verwandte aber trotzdem unterschiedliche Östrogenrezeptoren, *Esr1* und *Esr2* (72,212). Dabei ist der *Esr1* der vorherrschende Rezeptor im murinen Uterus, während der *Esr2* zwar auch nachgewiesen ist, aber nur in geringeren Mengen vorkommt (212). Es konnte in Studien gezeigt werden, dass östrogeninduzierte Reaktionen im Uterus nicht nur über den klassischen Weg ausgelöst werden, sondern auch über den nicht klassischen (212). Wobei aber der klassische Weg für die Einlagerung von Wasser verantwortlich gemacht wird und es so zu einem erhöhten Uterusfeuchtgewicht unter E₂-Einfluss kommt.

Das mRNA-Expressionsmuster der Östrogenrezeptoren *Esr1* und *Esr2* im Uterus ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Wie im Abbildungsteil A der Abbildung 4.4 zu sehen ist, unterscheiden sich die mRNA-Spiegel der Östrogenrezeptoren der WT- und ArKO-Mäuse dahingehend, dass die WT-Mäuse eine höhere Expressionsrate aufweisen als die ArKO-Mäuse. Dabei zeigt der *Esr1* eine 2,3-fache signifikant erhöhte Expression verglichen zu den vt ArKO-Mäusen.

Abbildung 4.4 (B) stellt behandlungsbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression des *Esr1* von WT- und ArKO-Mäusen dar. Die Expression des *Esr1* wird zwar in beiden Modellen durch Östradiol signifikant verringert, lediglich die Ausprägung des Effektes ist im Vergleich zur östrogendefizienten Gruppe unterschiedlich. So lässt sich feststellen, dass die kontrollbehandelten WT-Mäuse eine 5-fach verringerte Expression des *Esr1* aufweisen verglichen mit den E₂-behandelten ArKO-Mäusen, deren Expression nur um das 2,5-fache verringert ist. Beim *Esr2* hingegen ist eine inverse Regulation zwischen beiden Vergleichsgruppen nachgewiesen worden. Während bei den vt WT-Mäuse eine 5-fach

verringerte Expression zu beobachten ist, findet sich bei den ArKO E₂-Mäusen eine erhöhte Expression.

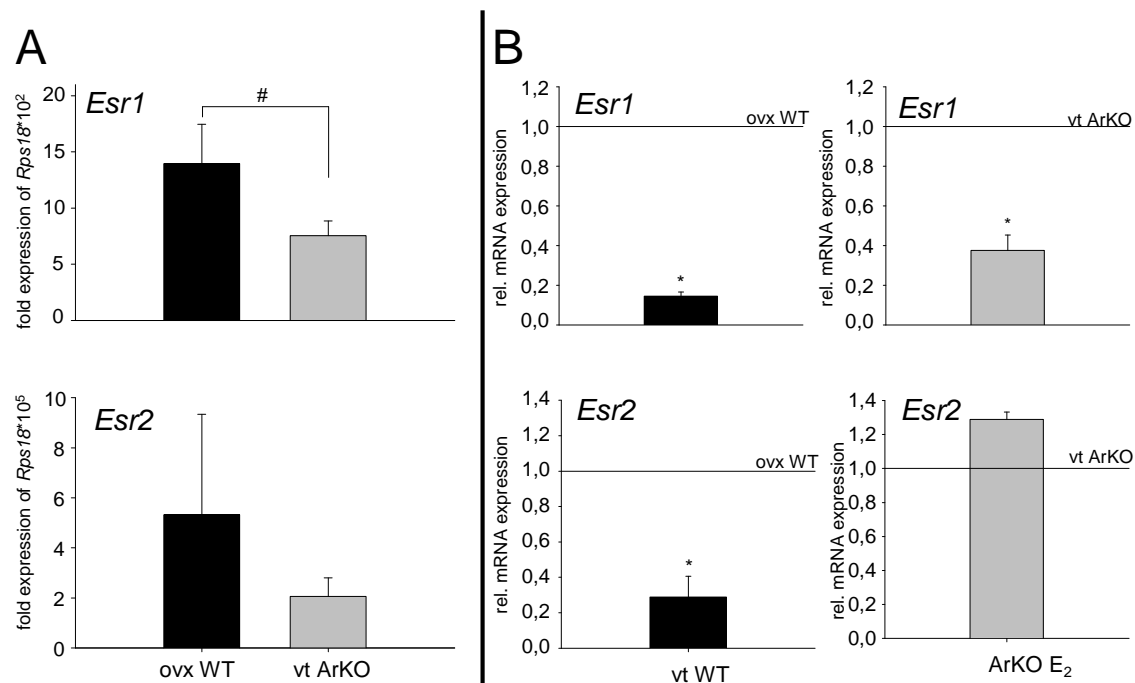


Abb. 4.4 Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovxWT und vt ArKO. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie).

Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung. *p≤0,05; #p<0,05

In Abbildung 4.5 ist das mRNA-Expressionsmuster etablierter Markergene zur Untersuchung von östrogeninduzierten Antworten dargestellt. Repräsentanten für diese Gruppe, die in diesem Versuch untersucht wurden, sind die Gene Progesteron Rezeptor (*Pgr*), Clusterin (*Clu*) und Lactoferrin (*Ltf*).

Wie in Abbildung 4.5 (A) zu sehen ist, finden sich keine signifikanten Unterschiede bei den Expressionsspiegeln der untersuchten Gene im Uterus zwischen den östrogendefizienten Gruppen ovx WT und vt ArKO. Man kann lediglich einen Trend dahingehend erkennen, dass die ovx WT-Mäuse beim *Pgr* (1,5-fache) einen höheren mRNA-Basiswert aufweisen als die vt ArKO-Mäuse. Beim *Ltf* zeigen die ovx WT-Mäuse eine um das 3-fach verringerte mRNA-Expression im Vergleich zu den vt ArKO Mäusen.

Aus Abbildung 4.5 (B) lässt sich entnehmen, dass die östrogenresponsiven Gene *Pgr*, *Clu* und *Ltf* in den vt WT-Mäusen generell eine erhöhte Expression aufweisen verglichen zu den ArKO E₂ Mäusen. Dabei zeigte der *Pgr* in Gegenwart von Östradiol in den vt WT-Mäusen eine 2-fach verringerte Expression, wohingegen die ArKO E₂-Mäuse eine 10-fache Verringerung der mRNA-Expression aufwiesen. *Clu* und *Ltf* zeigten bei vt WT- und ArKO E₂-Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression verglichen zu den östrogendefizienten Tieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression in den vt WT-Mäusen für *Clu* um das 2,5-fache und für *Ltf* um das 30-fache erhöht ist. Die mRNA-Expression von *Clu* in den ArKO E₂-Mäusen ist um das 1,5-fache, für *Ltf* um das 10-fache erhöht (Abb. 4.5 (B)).

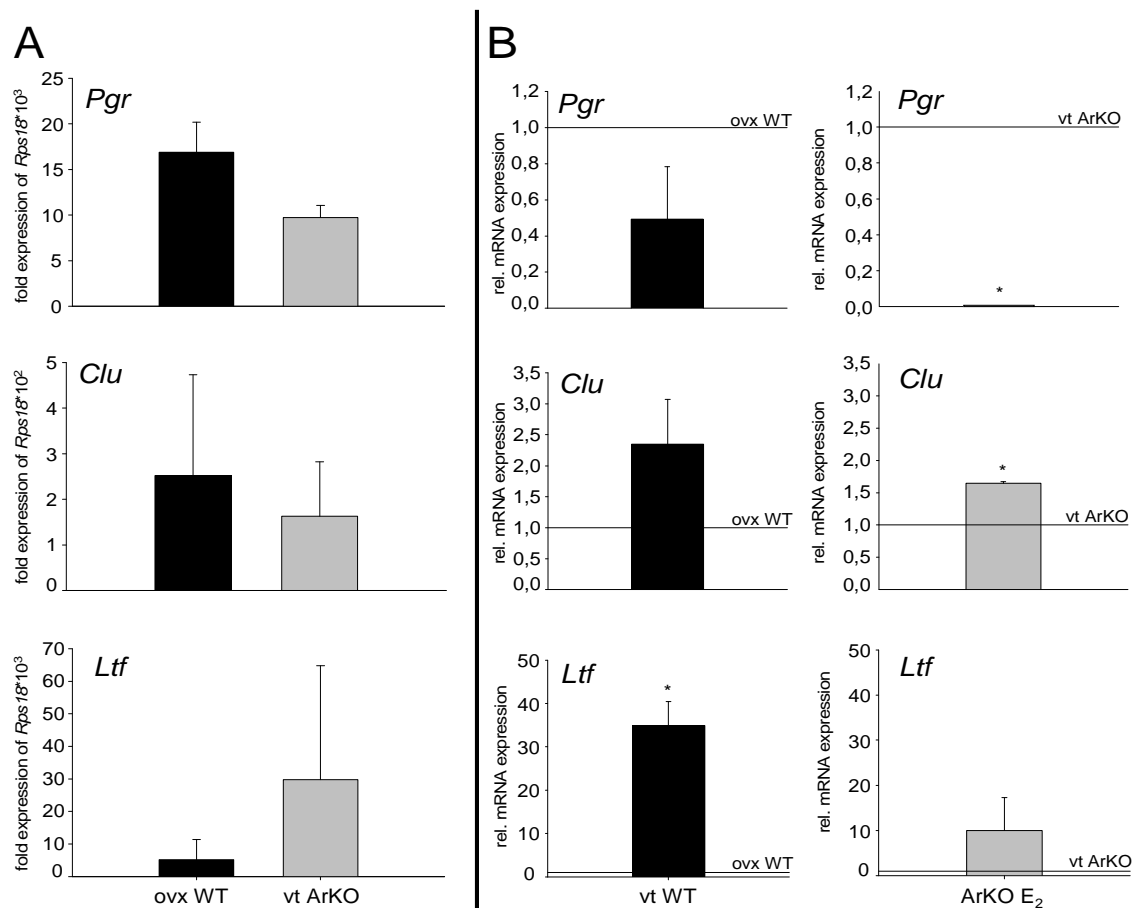


Abb. 4.5 Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus
(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovxWT und vt ArKO. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Pgr*, *Clu* und *Ltf* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. * $p \leq 0,05$

Die mRNA-Expression für Gene, welche möglicherweise eine Verbindung zwischen dem MetS und einer Östrogendefizienz bilden, sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Beispielhaft dafür sind der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte-Rezeptor γ (*Pparg*), Interleukin 6 (*Il6*) und der Tumor-Nekrose-Faktor α (*Tnfa*) in Organproben aus diesem Tierversuch untersucht worden. Für alle drei Gene lässt sich feststellen, dass beide Modelle im Uterus ein ähnliches östrogenabhängiges Regulationsmuster der mRNA-Expressionsmuster aufweisen. So haben die ovx WT-Mäuse für *Il6* eine signifikant 1,25-fach höhere mRNA-Expression verglichen mit den vt ArKO-Mäusen (Abb. 4.6 (A)).

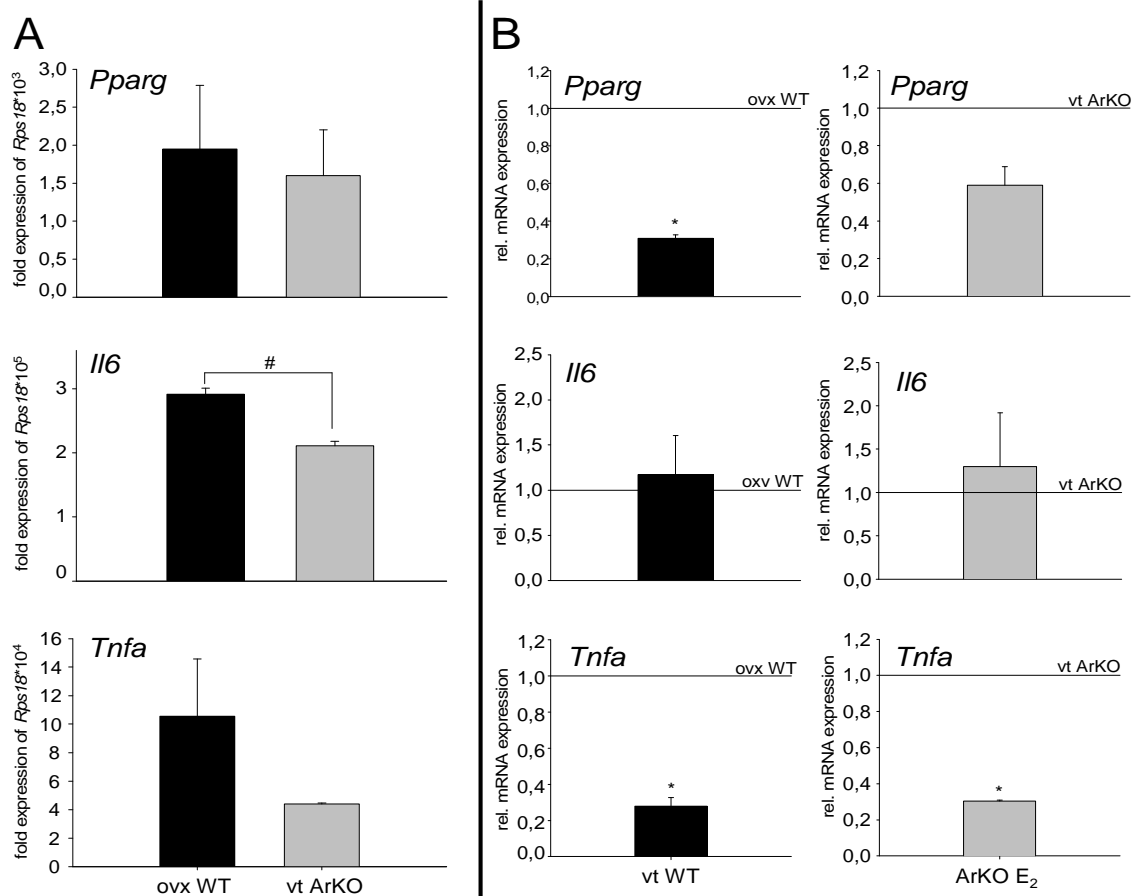


Abb. 4.6 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovx WT und vt ArKO. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie).

Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. * $p \leq 0,05$

Die in Abbildung 4.6 (B) dargestellte Genexpression von vt WT und ArKO E₂ Mäusen zeigt für den *Tnfa* in beiden Mausmodellen unter Östrogeneinfluss eine um das 3,3-fach niedrige Expression verglichen zu den östrogendefizienten Tieren. Ähnliches konnte auch für den *Pparg* nachgewiesen werden. Hier zeigte sich bei den vt WT-Mäusen ebenfalls eine 3,3-fach signifikant verringerte Expression. Bei den ArKO E₂ Mäusen war die mRNA-Expression des *Pparg* nur um das 2-fache verringert, jeweils im Vergleich zu den östrogendefizienten Tieren.

4.1.2.2 Gonadales Fettgewebe

Schon während der Sektion fiel ein deutlicher Unterschied dahingehend auf, dass das Feuchtgewicht des Fettgewebes der ArKO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen deutlich erhöht war. Diesen Effekt haben schon Jones *et al.* bereits beschrieben (115,116). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass nach einer E₂-Behandlung der ArKO-Mäuse das Gewicht des Fettgewebes geringer wurde. Aus diesem Grund erfolgte eine Untersuchung von mRNA-Spiegeln verschiedener östrogensensitiver Markergene. Weiter wurden aber auch Gene untersucht, die in Verbindung zum MetS stehen bzw. eine theoretische molekulare Verbindung zwischen dem MetS und einer Östrogendefizienz herstellen.

Wie in Abbildung 4.7 (A) zu sehen ist sind die Unterschiede der basalen Expressionsspiegel von *Esr1* und *Esr2* in beiden Mausmodellen marginal.

Der quantitative Nachweis der mRNA-Expression von *Esr1* zeigt ein heterogenes Regulationsmuster (Abb. 4.7 (B)). Während die vt WT-Mäusen keine Veränderung des *Esr1* in Abhängigkeit von Östradiol zeigen, wird die Expression des *Esr1* in den ArKO E₂ Mäusen um das 1,5-fache erhöht, jeweils im Vergleich zu den östrogendefizienten Gruppen. Beim *Esr2* hingegen zeigt sich ebenfalls keine Veränderung der Regulation in Folge des Östradiols in der vt WT-Gruppe, aber eine verringerte mRNA-Expression in der ArKO E₂ Gruppe, jeweils im Vergleich zu den östrogendefizienten Tieren.

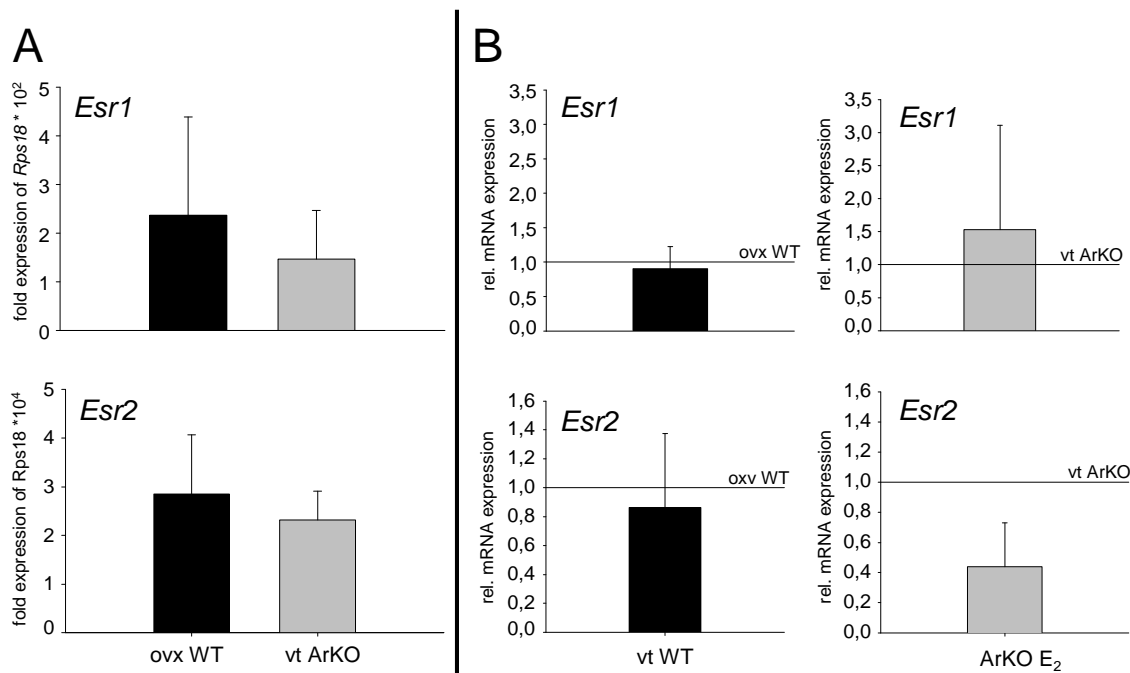


Abb. 4.7 Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovx und vt ArKO. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$

Die Expressionsspiegel der Gene, die eine Verbindung zwischen dem MetS und einer Östrogendefizienz bilden, sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Mit Abbildung 4.8 (A) wird gezeigt, dass die Unterschiede in der mRNA-Expression des *Pparg* zwischen den beiden Mausmodellen im gonadalen Fettgewebe marginal sind. Für *Il6* wurde allerdings eine signifikant 3-fache höhere, für *Tnfa* eine 30-fache höhere basale Expression in den ArKO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen festgestellt.

Mit der in Abbildung 4.8 (B) dargestellten Genexpression kann gezeigt werden, dass bei allen drei Genen (*Pparg*, *Il6* und *Tnfa*) die vt WT-Mäuse höhere Expressionsspiegel aufweisen als die ArKO E₂ Mäuse. Die unter Östrogeneinfluss stehenden vt WT-Tiere zeigen in der Regulation von *Pparg* keine Änderung in Abhängigkeit von Östradiol, während die ArKO E₂ Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren eine um das 2-fache verringerte Expression aufweisen. Für *Il6* konnte in beiden Modellen eine erhöhte Expression durch Östradiol nachgewiesen werden. Dabei erscheint die mRNA-Expression

von *Il6* in den unter Östrogeneinfluss stehenden WT-Mäusen um das 1,16-fache höher verglichen zu den ArKO E₂ Mäusen. Im Regulationsmuster des *Tnfa* kann man ein inverses östrogenes Regulationsmuster zwischen den vt WT-Mäusen und den ArKO E₂ Tieren beobachten. So zeigt sich eine 1,5-fach höhere Expression des *Tnfa* in den vt WT-Mäusen, während die Expressionsspiegel in den ArKO E₂ Mäusen um das 2-fache niedriger war als in den jeweiligen östrogendefizienten Mäusen.

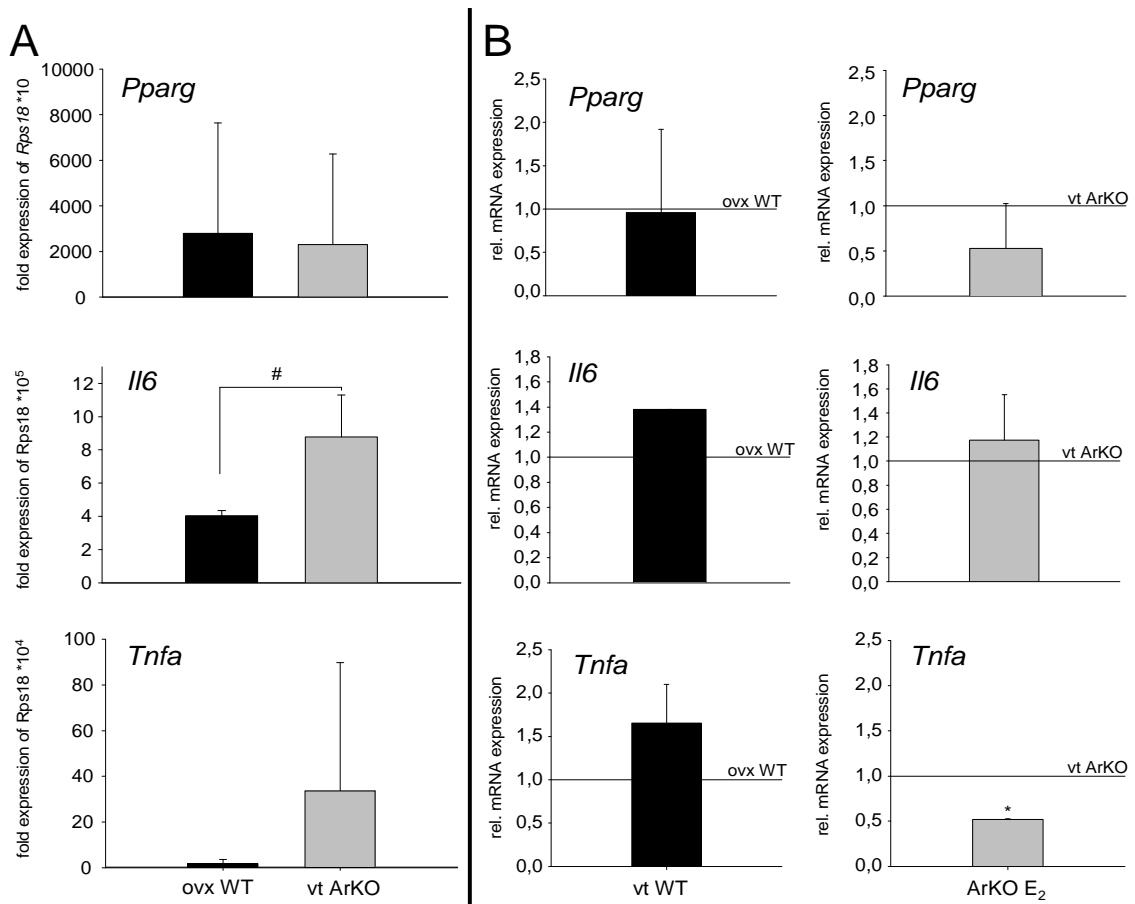


Abb. 4.8 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovx WT und vt ArKO. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie).

Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung. *p≤0,05; #≤0,05

Die Expression der Gene, die einen Zusammenhang mit der Pathogenese des MetS aufweisen, wie Leptin (*Lep*), Leptin Rezeptor (*Lepr*) und Insulinrezeptor (*Insr*), wurde ebenfalls im Rahmen dieses Tierversuches im gonadalen Fettgewebe untersucht (Abb. 4.9).

So zeigten sich in der basalen Expression dieser Gene (Abb. 4.9 (A)) Unterschiede in Abhängigkeit vom Modell. Während beim *Lep* die basale Expression in den ArKO-Mäusen 1,5-fach höher ist als bei den ovx WT-Mäusen, zeigten der *Lepr* eine 12-fache und der *Insr* eine 2,3-fache verringerte Expression in den vt ArKO-Mäusen verglichen mit den ovx WT-Mäusen.

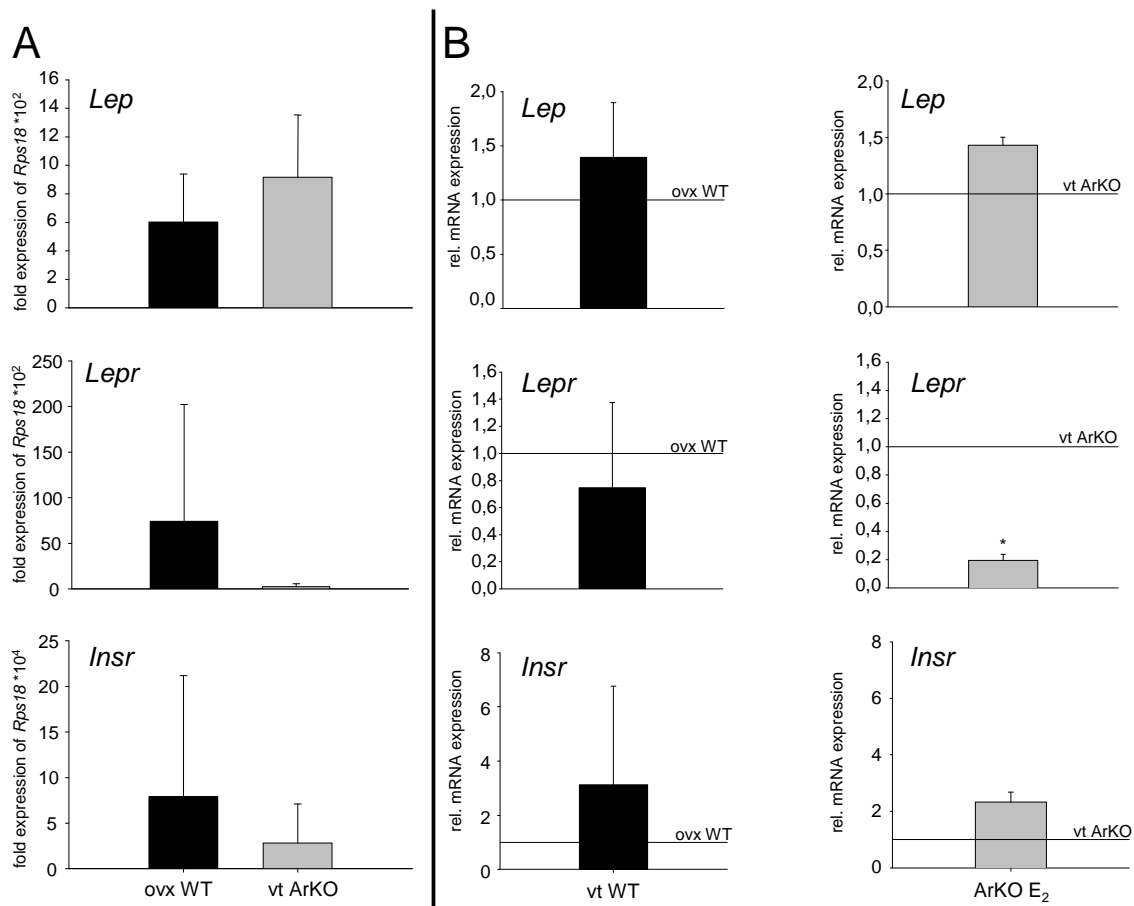


Abb. 4.9 Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der östrogendefizienten Gruppen ovx WT und vt ArKO. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Lep*, *Lepr* und *Insr* in östrogenisierten Tieren (vt WT bzw. ArKO E₂) und nicht östrogenisierten Tieren (ovx WT bzw. vt ArKO, horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung.

* $p \leq 0,05$; # $\leq 0,05$

Wie in Abbildung 4.9 (B) zu sehen ist, sind die relativen Expressionsspiegel im gonadalen Fettgewebe für *Lep* in den unter Östrogeneinfluss stehenden Tieren in beiden Modellen um das 1,5-fache erhöht. Eine erhöhte mRNA-Expression durch E_2 -Einfluss konnte auch für den *Insr* nachgewiesen werden. Dabei sind die Werte gemessen in den vt WT-Mäusen um das 3-fache, die in den ArKO E_2 Mäusen um das 2-fache erhöht. Eine verringerte Expression wurde für den *Lepr* nachgewiesen, hierbei wurde in den ArKO E_2 Mäusen eine 5-fach verringerte Expression im gonadalen Fettgewebe gefunden im Vergleich zu den vt ArKO-Mäusen.

4.2 Einfluss des Lebensalters auf die östrogene Responsivität (TV 2)

Der Alterungsprozess ist oft verbunden mit Gewichtszunahme durch Veränderung des Stoffwechsels einschließlich der Zunahme des Körperfettes. Mit der zweiten tierexperimentellen Studie (TV 2) sollte die Auswirkung des Alters auf die Östrogenresponsivität untersucht werden. Dazu wurden die ArKO-Mäuse mit unterschiedlichem Lebensalter mit Östradiol und dem Soja-Isoflavonoid Genistein behandelt. Untersucht wurden der Uterus als Zielorgan aus dem Reproduktionstrakt und das Fettgewebe als stoffwechselaktives Organ.

4.2.1 Einfluss des Alters auf physiologische und biochemische Parameter in der ArKO-Maus

Dass die ArKO-Maus eine altersassoziierte Adipositas entwickelt, wurde bereits durch Jones *et al.* beschrieben (116). Es wurde dort vermutet, dass es durch die Östrogendefizienz zu einer Akkumulation des abdominalen Fettgewebes kommt (116), da ein Östrogenmangel zu einer erhöhten Expression des im Hypothalamus gebildeten Neuropeptid Y kommt (213).

4.2.1.1 Einfluss des Alters auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen

Nach der Erfassung der Körpergewichte wurde, wie in Abbildung 4.10 dargestellt, eine deutliche Abhängigkeit vom Alter sichtbar. So sind jeweils die zwölf Monate alten Tiere in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen signifikant schwerer als ihre drei Monate

alten Pendants. Es konnte ebenfalls ein substanzspezifischer Effekt auf das Körpergewicht gezeigt werden. Während in der Kontrollgruppe wie auch in der E₂-behandelten Gruppe die zwölf Monate alten Tiere eine Gewichtszunahme um das 1,2-fache aufweisen, konnte nach der Behandlung mit Genistein eine Gewichtszunahme um das 1,6-fache beobachtet werden.

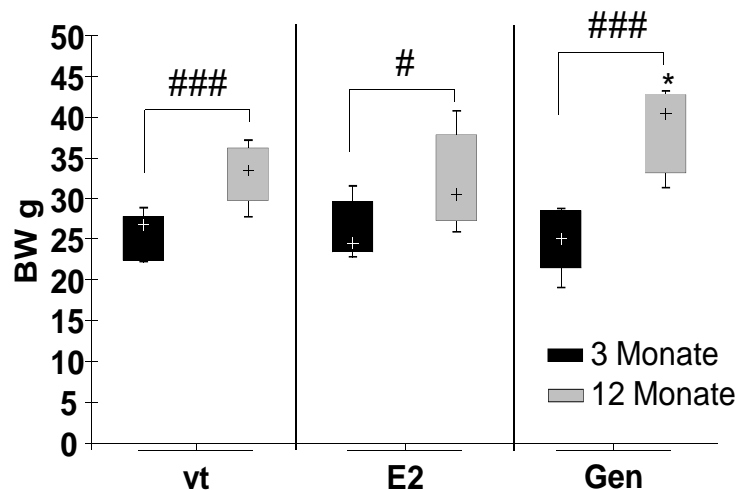


Abb. 4.10 Körpergewicht (BW)

Dargestellt ist das Körpergewicht der ArKO-Mäuse infolge einer subkutanen Applikation von vehicle, E₂, Genistein (Gen) während eines uterotrophen Assay. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. bezogen auf vt ArKO: *p ≤ 0,05; bezogen auf die drei Monate alten ArKO- Mäuse: #p ≤ 0,05; ###p ≤ 0,001

4.2.1.2 Einfluss des Alters auf die Östradiolempfindlichkeit im Uterus von ArKO-Mäusen

Zur Überprüfung altersabhängiger Unterschiede in den Uteri wurde nach der Kontrollbehandlung und nach den Behandlungen mit E₂ bzw. Genistein das Uterusfeuchtgewicht bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen lassen sich nur in den kontrollbehandelten Gruppen nachweisen (Abb. 4.11). So konnte gezeigt werden, dass das relative Uterusfeuchtgewicht der drei Monate alten Mäuse signifikant um das 2,5-fache schwerer ist verglichen mit ihren zwölf Monate alten Pendants. Ein deutlich signifikanter Unterschied, verglichen mit den jeweiligen kontrollbehandelten Gruppen, konnte nach der E₂-Behandlung in beiden Altersgruppen nachgewiesen werden. Hier war das Uterusfeuchtgewicht nach der E₂-Behandlung verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe bei den drei Monate alten

ArKO-Mäusen um das 6-fache signifikant schwerer, bei den zwölf Monate alten Tieren um das 6,2-fache signifikant schwerer. Kein altersbedingter Unterschied wie auch kein Einfluss der Prüfsubstanzen ließen sich nach der Behandlung mit Genistein beobachten. Im Trend lässt sich zwar erkennen, dass die zwölf Monate alten ArKO-Mäuse einen leichteren Uterus haben, dieser Unterschied konnte aber nicht mit einer statistischen Signifikanz bestätigt werden. Verglichen mit den kontrollbehandelten ArKO-Mäusen konnte keine Gewichtsveränderung des relativen Uterusfeuchtgewichtes beobachtet werden.

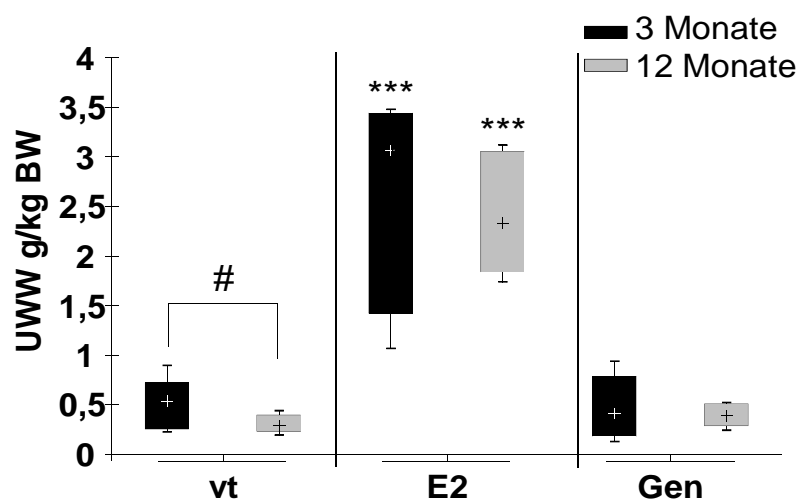


Abb. 4. 11 Uterusfeuchtgewicht (UWW)

Dargestellt ist das Uterusfeuchtgewicht der ArKO-Mäuse nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 2. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. bezogen auf vt ArKO: *** $p \leq 0,001$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p \leq 0,05$

4.2.1.3 Einfluss des Alters auf das Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen mit und ohne Östradiolbehandlung

Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- oder E₂ behandelten ArKO-Mäusen beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied wurde aber nach der Behandlung mit Genistein festgestellt. In diesem Fall konnte für die zwölf Monate alten Tiere ein 3-fach signifikant schwereres Feuchtgewicht

des infrarenalen Fettgewebes nachgewiesen werden im Vergleich zu den drei Monate alten Tieren.

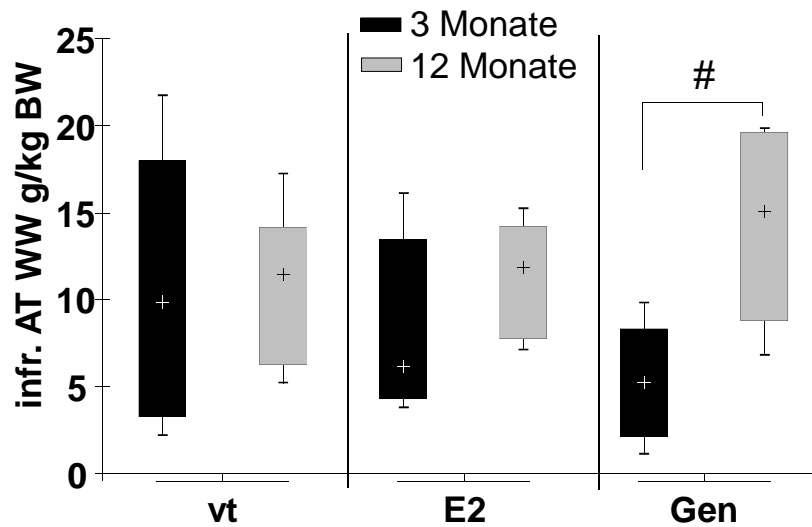


Abb. 4.12 Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (infr. AT WW)
Dargestellt ist das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 2. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. bezogen auf die drei Monate alten ArKO- Mäuse: #p ≤ 0,05 verwendet.

4.2.1.4 Einfluss des Alters auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen

Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Leptin-Spiegels in den E₂ und Genistein substituierten Tieren beobachtet.

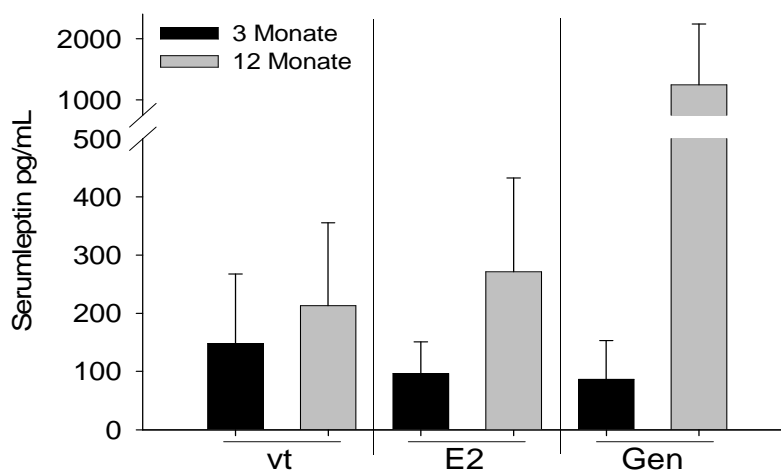


Abb. 4.13 Serumleptin-Konzentration in pg/mL
Dargestellt ist die Serumleptin-Konzentration in ArKO-Mäuse nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 2.

Allerdings fällt auf, dass der Serumleptin-Spiegel der zwölf Monate alten Tiere im Trend höher ist als im Vergleich zu den drei Monate alten Mäusen. Besonders sticht der Wert der zwölf Monate alten mit Genistein behandelten Tiere hervor. Dieser Wert ist in den zwölf Monate alten Tieren um das 20-fache höher als in den drei Monate alten mit Genistein behandelten ArKO-Mäusen.

4.2.1.5 Einfluss des Alters auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen

Als ein weiterer biochemischer Marker wurde der Plasmaglukose-Spiegel gemessen. Zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen sowie zwischen den beiden Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Es fällt allerdings auf, dass die älteren Tiere generell einen leicht höheren Wert haben verglichen mit den drei Monate alten Tieren (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Einfluss des Lebensalters auf die Genexpression

Ausgehend von den physiologischen und biochemischen Daten stellte sich die Frage, ob sich altersabhängige Veränderungen in der Regulation der Expression von Markergenen im Uterus und im Fettgewebe nachweisen lassen.

In den folgenden Abschnitten sind die Abbildungen wie folgt aufgebaut, im linken Teil (A) ist der mRNA-Spiegel ($2^{-\Delta Ct}$) dargestellt. Dabei sind die Werte gegen das Housekeeping-Gen *Rps18* normalisiert. Dieser Abbildungsteil stellt somit die Grundexpression beider untersuchten kontrollbehandelten Altersgruppen von drei und zwölf Monaten dar. Im rechten Teil der Abbildung (B) wird die Genexpression nach der Behandlung der entsprechenden Altersgruppe im Bezug zu der gleichaltrigen unbehandelten vt ArKO Gruppe gezeigt ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).

4.2.2.1 Uterus

Wie schon durch das Uterusfeuchtgewicht festgestellt wurde, war in den zwölf Monate alten vt ArKO-Mäusen der Uterus signifikant leichter als bei den drei Monate alten ArKO-Mäusen (Abb. 4.11). Um die molekulare Grundlage dieser Veränderung näher zu

charakterisieren, wurden Genexpressionsanalysen mit organspezifischen Markergenen durchgeführt.

In Abbildung 4.14 sind die relativen mRNA-Spiegel der Östrogenrezeptoren, welche durch Östrogen reguliert werden, dargestellt.

Wie in Abbildung 4.14 (A) zu sehen ist, unterschieden sich die Spiegel für *Esr1* und *Esr2* der drei und zwölf Monate alten ArKO-Mäuse deutlich. Beim *Esr1* wiesen die zwölf Monate alten Tiere einen signifikant über 40-fach höheren mRNA-Basiswert auf. Anders verhielt es sich beim *Esr2*, hier wurde bei den drei Monate alten Tieren eine höhere Expression nachgewiesen.

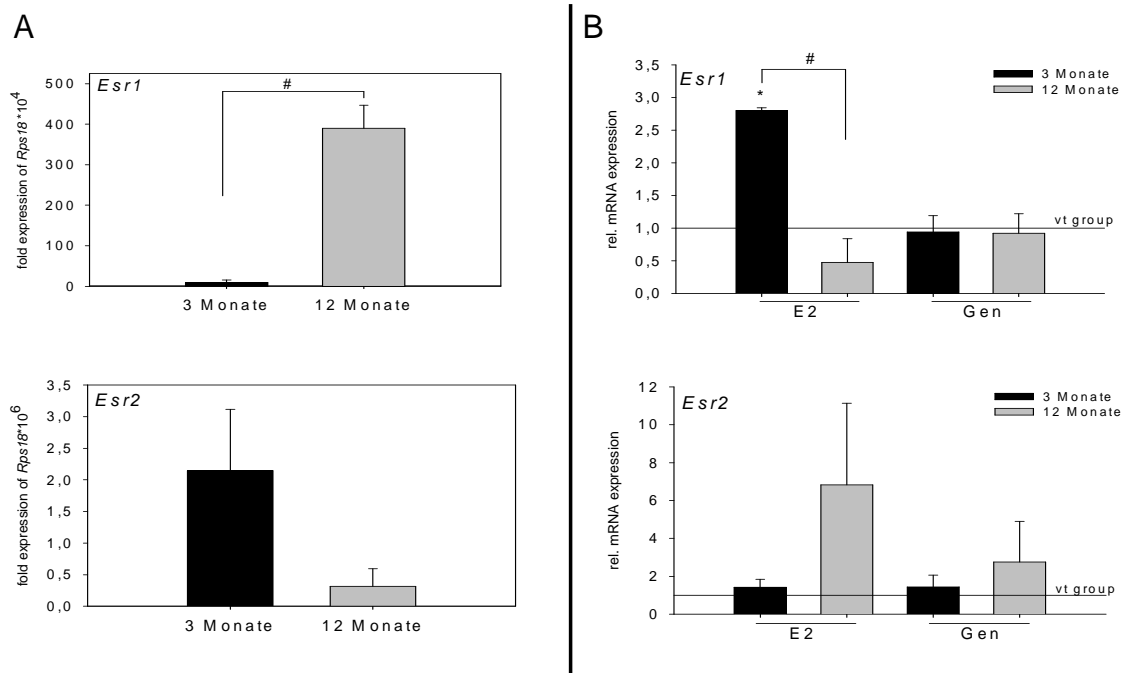


Abb. 4.14 Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vt-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* in E₂ bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Nach der jeweiligen Behandlung mit E₂ und Genistein zeigte sich der Altersunterschied zum Teil noch deutlicher, wie in Abb. 4.14 (B) zu sehen ist. So konnte nachgewiesen

werden, dass nach einer E_2 -Behandlung die Expression des *Esr1* in drei Monate alten Tieren um das 2,5-fache und beim *Esr2* die Expression in zwölf Monate alten Tieren um das 6-fache erhöht war im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Im Fall des *Esr1* konnte sogar festgestellt werden, dass es zu einer altersabhängig inversen Regulation kam. In diesem Fall war eine erhöhte Expression des *Esr1* mRNA-Spiegels in den drei Monate alten Tieren nach der E_2 -Behandlung beobachtet worden, während er in den zwölf Monate alten Tieren 2-fach herunterreguliert wurde, jeweils bezogen auf die Kontrollbehandlung. Dieser Unterschied ist sogar signifikant. Durch die Genisteinbehandlung konnte für den *Esr1* keine veränderte Regulation gezeigt werden gleich welchen Alters die Tiere waren. Beim *Esr2* zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster nach der Genisteinbehandlung wie es nach der E_2 -Behandlung beobachtet wurde, die zwölf Monate alten Tiere zeigten eine 2-fach höhere Expression im Vergleich zu den drei Monate alten Tieren wie auch zu den Kontrolltieren.

Die östrogenregulierten Markergene *Pgr* und *Ltf* wiesen eine ähnliche basale Expression auf (Abb. 4.15 (A)). Bei beiden Genen hatten die drei Monate alten Tiere eine 5-fach höhere mRNA-Expression verglichen mit den zwölf Monate alten Tieren. Bei *Clu* hingegen wiesen die zwölf Monate alten Tiere eine 1,5-fache höhere mRNA-Expression auf verglichen mit den drei Monate alten Tieren. Allerdings enthält keine dieser Beobachtungen Werte von statistischer Signifikanz.

Die mRNA-Expression des *Pgr*, als östrogenreguliertes Gen, wurde nach der Behandlung mit E_2 in den drei Monate alten Tieren um das 1,5-fache erhöht, während bei den zwölf Monate alten Tieren in Folge der Behandlung keine Veränderung eintrat verglichen mit den Kontrolltieren (Abb. 4.15 (B)). Nach der Behandlung mit Genistein allerdings konnte eine signifikant 10-fach verringerte Expression der *Pgr* mRNA in den drei Monate alten ArKO-Mäusen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, festgestellt werden. Die mRNA-Expression des *Pgr* der zwölf Monate alten ArKO-Mäuse ist im Vergleich zu den Kontrolltieren um das 1,2-fache erhöht. Der Unterschied zwischen den drei und zwölf Monate alten Tieren ist statistisch signifikant. Beim *Ltf* kam es nach einer E_2 Substitution in beiden Altersgruppen zu erhöhten Expressionsspiegeln verglichen mit den

Kontrollgruppen (Abb. 4.15 (B)). Dabei liegt die Expression des *Ltf* signifikant 12-fach höher in den zwölf Monate alten Tieren verglichen mit den drei Monate alten Tieren. Nach der Genisteinbehandlung zeigte sich im Gegensatz zur E₂-Behandlung eine niedrigere mRNA-Expression des *Ltf* in beiden Altersgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Hier zeigten die drei Monate alten Tiere für das Gen *Ltf* im Uterus eine signifikante Herunterregulation verglichen mit den zwölf Monate alten Tieren.

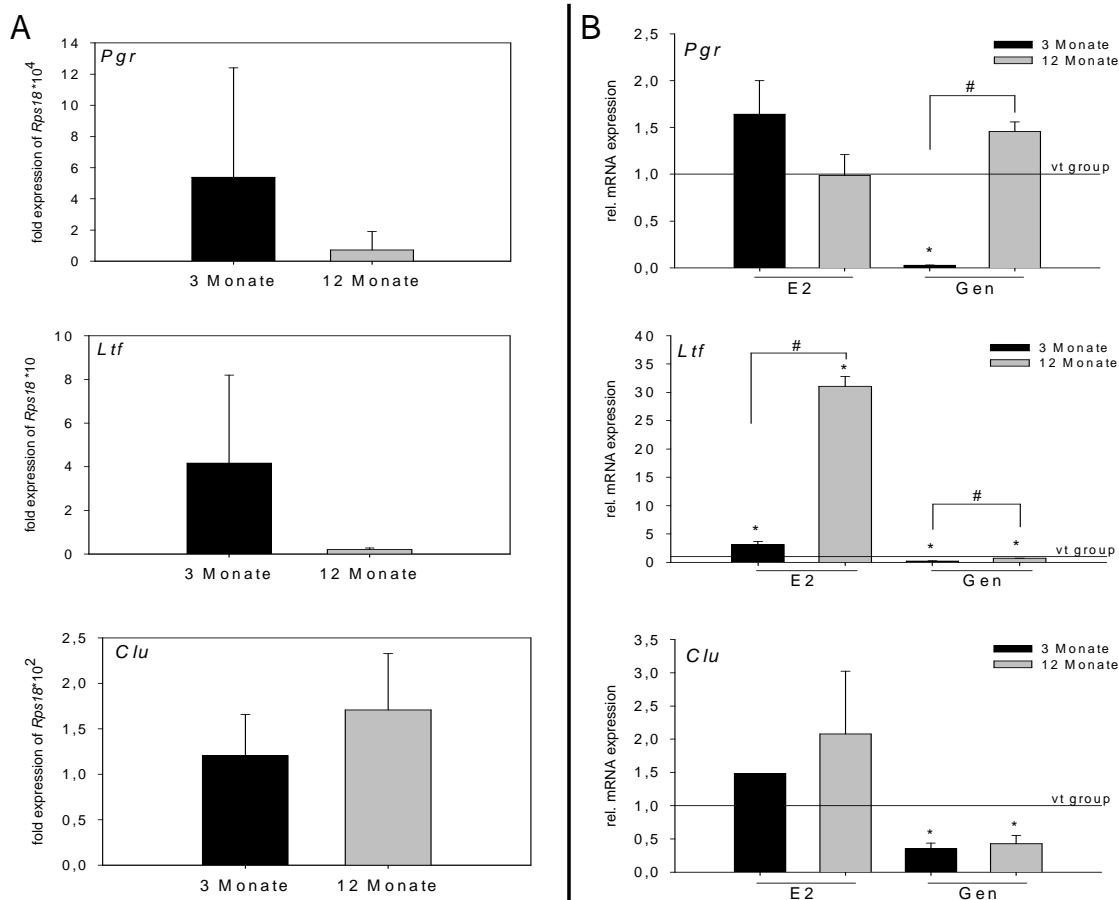


Abb. 4.15 Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Pgr*, *Ltf* und *Clu* in E₂ bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Neben einem Substanzeffekt konnte bei der mRNA-Expression des Gens *Clu* auch ein altersbedingter Regulationsunterschied gezeigt werden. In beiden Altersgruppen konnte

zwar nach einer E_2 -Behandlung eine erhöhte mRNA-Expression von *Clu* beobachtet werden, aber die uterine mRNA der zwölf Monate alten Tiere wurde um das 1,3-fache höher reguliert. Nach der Behandlung mit Genistein wurde zwar für beide Altersgruppen eine signifikant niedrigere mRNA-Expression festgestellt, diese zeigte aber keine altersabhängigen Unterschiede (Abb. 4.15 (B)).

Gene, die eine Verbindung der Östrogendefizienz mit dem MetS aufweisen, werden in der Abbildung 4.16 dargestellt. Die drei Monate alten ArKO-Mäuse zeigten in der mRNA-Expression für die Gene *Pparg* (8-fach) und *Tnfa* (12-fach) eine erhöhte basale Expression verglichen zu den zwölf Monate alten Tieren (Abb. 4. 16 (A)). Für *Il6* hingegen konnte eine 8-fach höhere Expression in der uterinen mRNA der zwölf Monate alten Tiere gegenüber den drei Monate alten ArKO-Mäusen gezeigt werden.

Bei *Pparg* und *Tnfa* ist ein altersspezifisches Muster der östradiolabhängigen Genexpression zu erkennen (Abb. 4.16 (B)). So zeigte die mRNA-Expression des *Pparg* im Uterus der zwölf Monate alten ArKO-Mäusen eine signifikant 4-fache höhere mRNA-Expression verglichen zu der mRNA-Expression im Uterus der drei Monate alten Tiere gleicher Behandlung. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte die mRNA-Expression im Uterus der drei Monate alten ArKO-Mäuse nach der Behandlung mit E_2 (2,5-fach) bzw. Genistein (5-fach) eine niedrigere Expression für den *Pparg*. In den Uteri der zwölf Monate alten Tiere hingegen wurde für den *Pparg* nach der E_2 -Behandlung eine um das 1,2-fache erhöhte Expression im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen. Damit liegt für den *Pparg* nach der E_2 -Behandlung eine inverse Regulation seiner mRNA-Expression in Abhängigkeit des Alters vor. Eine Genisteinbehandlung hingegen resultiert im Uterus beider Altersgruppen in einer verringerten mRNA-Expression des *Pparg* verglichen mit den Kontrolltieren. Allerdings wurde der *Pparg* im Uterus der drei Monate alten Tiere signifikant 8-fach niedriger exprimiert als in den zwölf Monate alten Tieren.

Nach der Behandlung mit E_2 bzw. Genistein zeigte der *Tnfa* im Uterus der drei Monate alten ArKO-Mäuse jeweils eine um das 15-fache bzw. 6-fache Hochregulation der mRNA-Spiegel verglichen mit den Kontrolltieren. Die zwölf Monate alten Tiere zeigten

hingegen eine Herunterregulation der mRNA im Uterus verglichen mit den Kontrolltieren. Im Fall von *Tnfa* kann man also von einem invertierten östrogenen Regulationsmuster in Abhängigkeit des Alters sprechen.

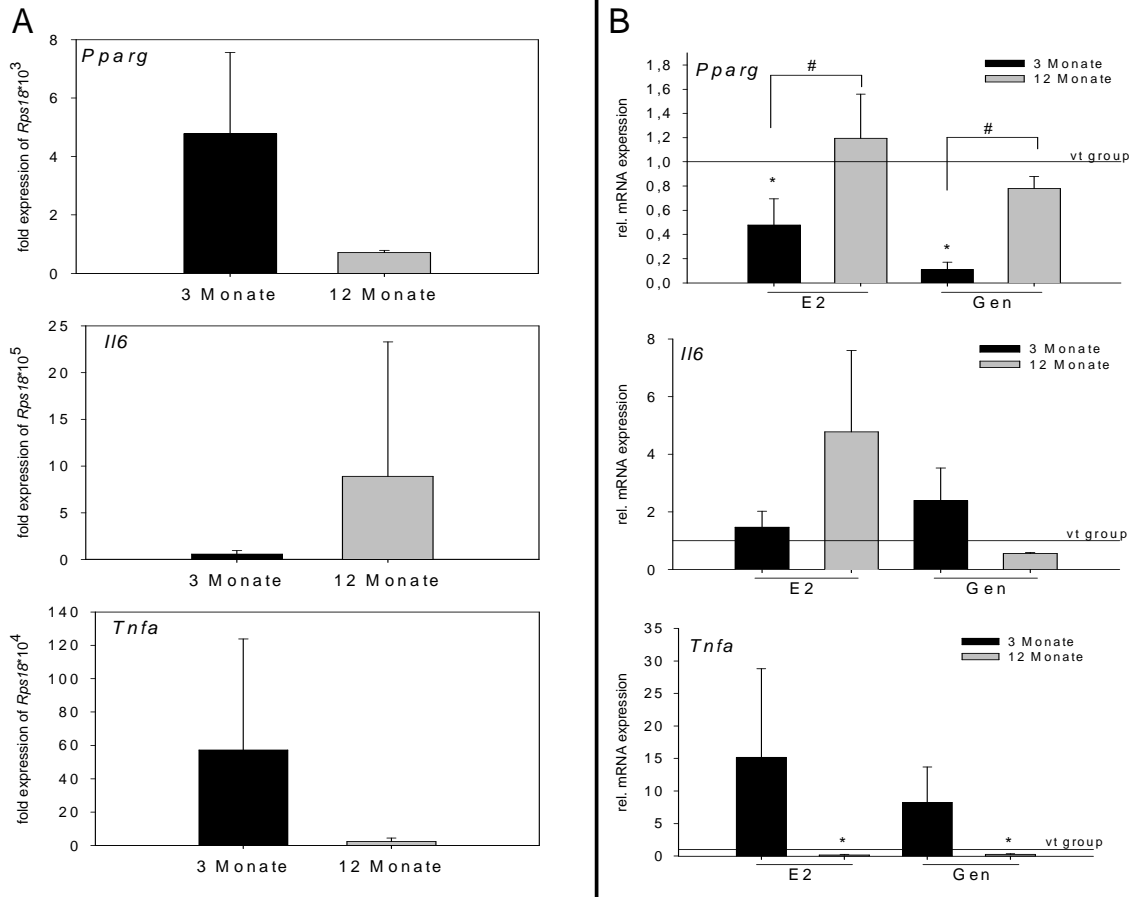


Abb. 4.16 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* in E_2 bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p < 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Die Regulation der Expression von *Il6* zeigt ein wesentlich uneinheitlicheres Bild (Abb. 4.16 (B)). Während nach der Behandlung mit E_2 bei den drei Monate alten Tieren kaum von einer Veränderung der Regulation nach E_2 -Behandlung gesprochen werden kann, konnte für die zwölf Monate alten Tiere eine 4-fach erhöhte mRNA-Expression des *Il6* im Vergleich zu Spiegeln der Uteri der Kontrolltiere nachgewiesen werden. Im

Gegensatz dazu wurde nach der Behandlung mit Genistein eine 2-fach höhere Expression in den drei Monate alten Tieren, aber eine 2-fach niedrigere Expression in den zwölf Monate alten Tieren jeweils im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt.

4.2.2.2 Gonadales Fettgewebe

Der Nachweis der Östrogenresponsivität im Fettgewebe wurde über die Regulation der mRNA der Östrogenrezeptoren geführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Die basalen Expressionsspiegel, wie in Abbildung 4.17 (A) zu sehen, zeigten deutliche altersbedingte Unterschiede. So zeigten die drei Monate alten Tiere eine 9-fach höhere Expression des *Esr1* im gonadalen Fettgewebe als bei den zwölf Monate alten ArKO-Mäusen. Die Expression des *Esr2* hingegen war in den drei Monate alten Tieren über das 250-fache niedriger verglichen mit den zwölf Monate alten Tieren.

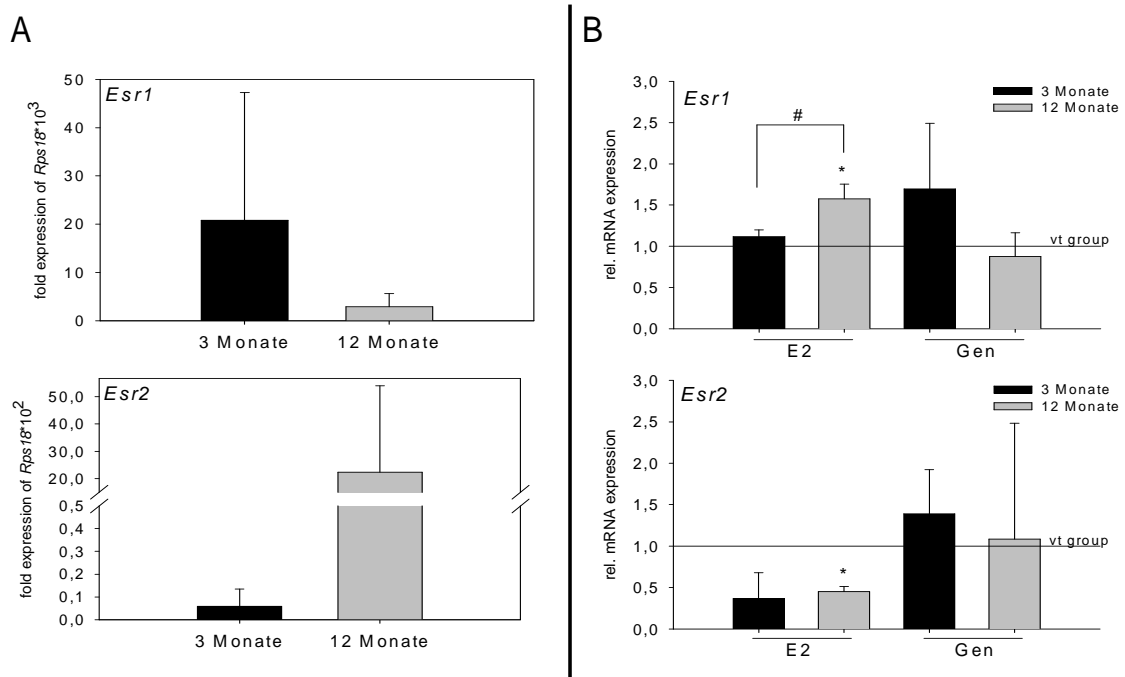


Abb. 4. 17 Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* in E_2 bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Nach der Behandlung mit E_2 bzw. Genistein konnte ebenfalls ein altersbedingter Unterschied der Regulation der Expression erkannt werden (Abb. 4.17 (B)). So resultiert eine E_2 -Behandlung bei *Esr1* in einer signifikant 1,6-fachen höheren mRNA-Expression im gonadalen Fettgewebe zwölf Monate alter ArKO-Mäusen verglichen mit drei Monate alten Tieren. Im gonadalen Fettgewebe wurde nach der E_2 -Behandlung bei den drei Monate alten Mäusen keine Veränderung des Expressionsmuster des *Esr1* zu den Kontrolltieren beobachtet. Während aber im gonadalen Fettgewebe der zwölf Monate alten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren sich eine 1,5-fach höhere Expression zeigte. Nach der Behandlung mit Genistein ist ein Trend dahingehend zu beobachten, dass es zu einer 1,5-fachen Erhöhung der mRNA von *Esr1* in den drei Monate alten Tieren kommt, während sich keine Veränderung nach E_2 -Gabe in den zwölf Monate alten Tieren zeigte. Für den *Esr2* zeigte sich ein Substanzeffekt, während bei den Behandlungsgruppen nach der E_2 -Behandlung 2-fach niedrigere mRNA-Spiegel nachgewiesen werden konnten, stellte sich in Folge der Genisteinbehandlung keine veränderte Regulation der Expression, bezogen auf die Kontrollgruppen, ein.

Gene, die mit der Pathogenese des MetS assoziiert sind, sind unter anderem *Lep* und *Lepr* (Abb. 4.18). Bei beiden Genen fällt auf, dass jeweils die basale Expression im gonadalen Fettgewebe der drei Monate alten ArKO-Mäuse höher ist im Vergleich zu der im Fettgewebe zwölf Monate alter Tiere (Abb. 4.18 (A)). Dabei wurde *Lep* in den drei Monate alten Tieren um das 3-fache und der *Lepr* um das 7-fache höher exprimiert als in den zwölf Monate alten Tieren.

Durch die Behandlung mit E_2 sowie mit Genistein wurde analog zu der basalen Expression eine Erhöhung der Expression der mRNA von *Lep* und *Lepr* in den drei Monate alten Tieren verglichen zu den älteren Tieren identifiziert (Abb. 4.18 (B)). Für *Lep* konnte jeweils verglichen mit der Kontrollgruppe eine 5-fach höhere mRNA-Expression nach der Behandlung mit E_2 und eine 30-fach höhere Expression nach der Behandlung mit Genistein im gonadalen Fettgewebe der drei Monate alten Tieren nachgewiesen werden. Beim *Lepr* zeigte sich verglichen zu der Kontrollgruppe eine 2-fach höhere Expression nach der E_2 -Behandlung und eine 5-fach höhere Expression nach der Genisteinbehandlung

bei den drei Monate alten Tieren. Die zwölf Monate alten Tiere zeigten nach der Behandlung mit E₂ bzw. Genistein kein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ähnlich war die Situation im gonadalen Fettgewebe zwölf Monate alter Tiere in beiden Behandlungsgruppen für die mRNA-Spiegel des *Lep*.

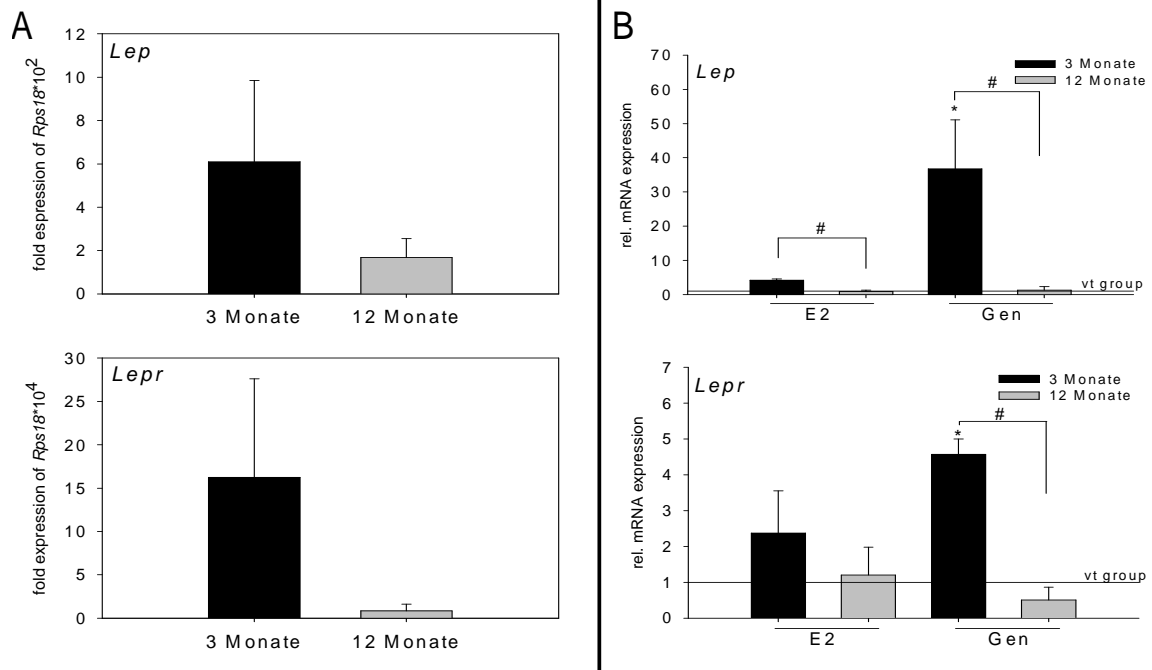


Abb. 4. 18 Expression der Gene mit Verbindung zur Pathogenese des MetS im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der kontrollbehandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Lep* und *Lepr* in E₂ bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; Bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Im Zusammenhang mit dem TV 2 wurden auch die Gene *Pparg*, *Tnfa* und *Il6* im gonadalen Fettgewebe untersucht (Abb. 4.19).

Den Genen *Pparg* und *Il6* ist gemein, dass das gonadale Fettgewebe drei Monate alter ArKO-Mäuse verglichen mit dem der zwölf Monate alten Tiere eine höhere basale Expression aufwies (Abb. 4.19 (A)). Für *Pparg* ist dieser 2,5-fache Unterschied statistisch signifikant. Für *Tnfa* zeigte sich hinsichtlich des Alters kein Unterschied bezüglich der basalen mRNA-Expression.

In beiden Behandlungsgruppen wurde die mRNA des *Pparg* im gonadalen Fettgewebe drei Monate alter Tiere verglichen mit den zwölf Monate alten ArKO-Mäusen um das 1,5-fache höher exprimiert. Weiterhin konnte altersabhängig ein inverses Muster der Regulation der Expression von *Pparg* durch E_2 festgestellt werden, die drei Monate alten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhöhte, die zwölf Monate alten Tiere eine verringerte Expression des *Pparg* im gonadalen Fettgewebe von beiden Behandlungsgruppen (Abb. 4.19 (B)).

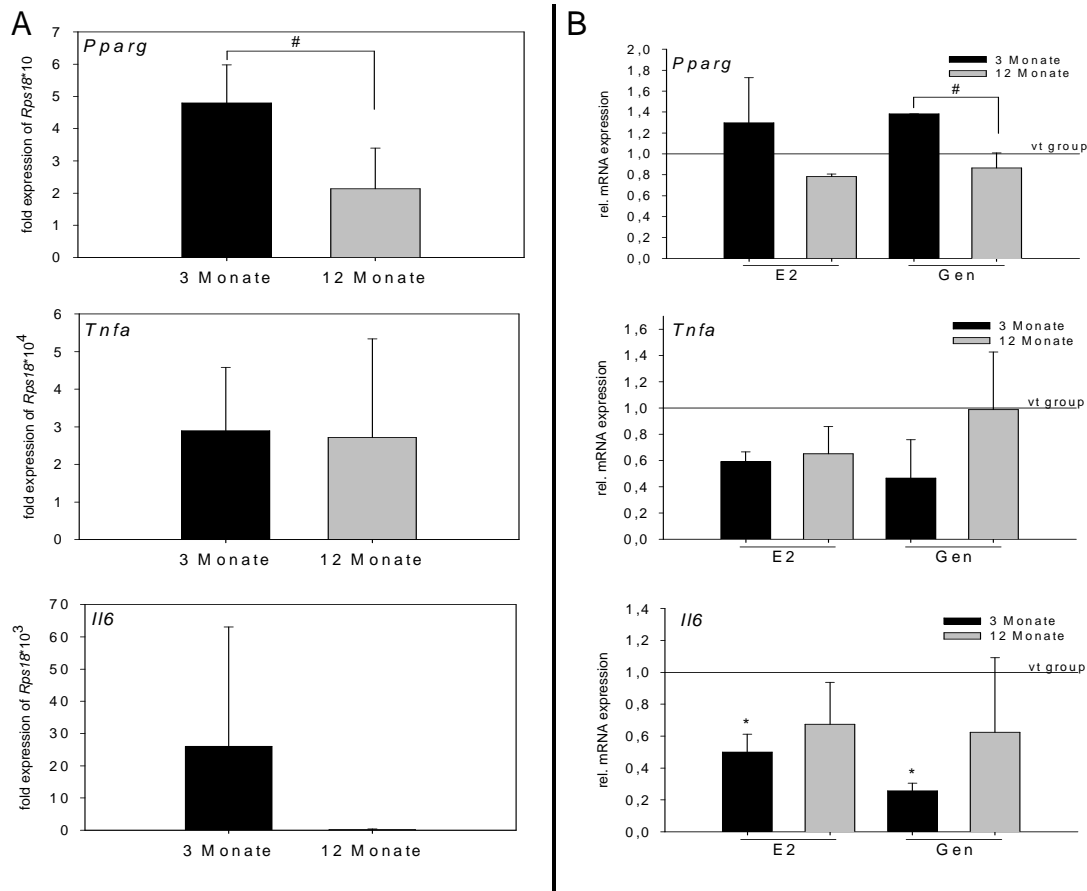


Abb. 4.19 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Pparg*, *Tnfa* und *Il6* in E_2 bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Die Regulation der mRNA-Expression des *Tnfa* wies eine 1,6-fach verringerte Expressionsrate nach der Behandlung mit E_2 in beiden Altersgruppen aus verglichen mit den Kontrolltieren (Abb. 4.19 (B)). Die Behandlung mit Genistein resultierte in einer 2,5-fach geringeren mRNA-Expression des *Tnfa* bei den drei Monate alten Tieren, während es keine Veränderung in Folge der E_2 -Behandlung bei den zwölf Monate alten Tieren gab. Ähnlich verhielt es sich auch für die östrogene Regulation der Expression des Genes *Il6*. Beide Behandlungen resultierten in einer verringerten Expression der *Il6* mRNA. Allerdings zeigte das Ausmaß der Herunterregulation altersbedingte Unterschiede. So zeigten die zwölf Monate alten Tiere im Vergleich zu den drei Monate alten Mäusen nach der E_2 -Behandlung eine 1,2-fach höhere *Il6*-mRNA-Expression im gonadalen Fettgewebe. Die Behandlung mit Genistein resultiert in einer 3-fach höheren Expression des *Il6* ebenfalls im gonadalen Fettgewebe zwölf Monate alter Tiere.

4.2.2.3 Infrarenales Fettgewebe

Zusätzlich zu den physiologischen Parametern (Abb.4.12) wurde im TV 2 ebenfalls die mRNA-Expression im infrarenalen Fettgewebe der beiden Altersgruppen untersucht.

Die mRNA-Spiegel beider Östrogenrezeptoren zeigten eine höhere basale Expression im infrarenalen Fettgewebe der drei Monate alten ArKO-Mäuse. Dabei waren die Spiegel des *Esr1* etwa um das 20-fache und der *Esr2* um das 4-fache in den drei Monate alten Tieren höher exprimiert als bei den zwölf Monate alten Tieren (Abb. 4.20 (A)).

Im infrarenalen Fettgewebe konnte sowohl in den E_2 -behandelten Tiere als auch mit den Genistein behandelten Tiere eine verringerte Expression der mRNA oder keine Veränderung des *Esr1* mRNA-Spiegels nach Hormongabe verglichen zu den mRNA-Spiegeln in den Kontrolltieren gezeigt werden (Abb. 4.20 (B)). Im Vergleich der beiden Altersgruppen trat eine Umkehrung des Regulationsmusters der mRNA des *Esr1* auf. Hierbei war die mRNA-Expression des *Esr1* nach der E_2 -Behandlung im infrarenalen Fettgewebe zwölf Monate alter Tiere um das 1,7-fach höher exprimiert als in den drei Monate alten Tieren. Die Genisteinbehandlung resultierte in einer 3-fach höheren Expression des *Esr1* im infrarenalen Fettgewebe zwölf Monate alter Tiere verglichen zu drei Monate alter ArKO-Mäusen (Abb. 4.20 (B)).

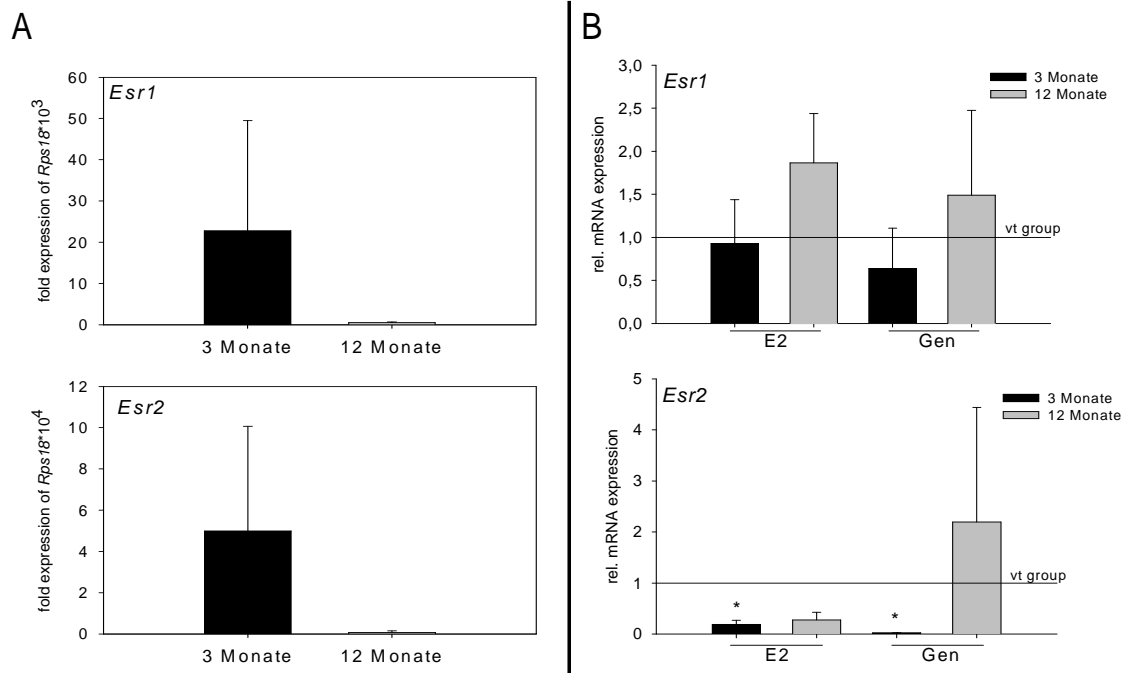


Abb. 4.20 Expression der Östrogenrezeptoren im infrarenalen Fettgewebe
(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* in E_2 bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Die relative Expression des *Esr2* zeigte nach der Behandlung mit E_2 eine 2-fach niedrigere Expressionsrate im infrarenalen Fettgewebe beider Altersgruppen verglichen mit dem der Kontrolltiere. Die Regulation der mRNA-Expression des *Esr2* nach der Genisteinbehandlung war im infrarenalen Fettgewebe drei Monate alten ArKO-Mäusen signifikant um das 10-fache herunterreguliert verglichen mit den Kontrolltieren. Der *Esr2* zeigte im infrarenalen Fettgewebe zwölf Monate alte Tiere nach der Genisteinbehandlung hingegen eine 2-fach erhöhte Expression.

Die mRNA-Expression der Gene, die für das MetS charakteristisch, sind zeigte bezüglich der basalen Expression ein deutlich altersabhängiges Muster. So wurde *Lep* im infrarenalen Fettgewebe zwölf Monate alte ArKO-Mäuse 30-fach höher exprimiert gefunden als in den drei Monate alten Tieren (Abb. 4.21 (A)). Auch der *LepR* (5-fach) und

der *Insr* (300-fach) zeigen in den zwölf Monate alten Tieren einen deutlich höheren basalen Expressionsspiegel verglichen zu dem der drei Monate alten Tiere (Abb. 4.21 (A)).

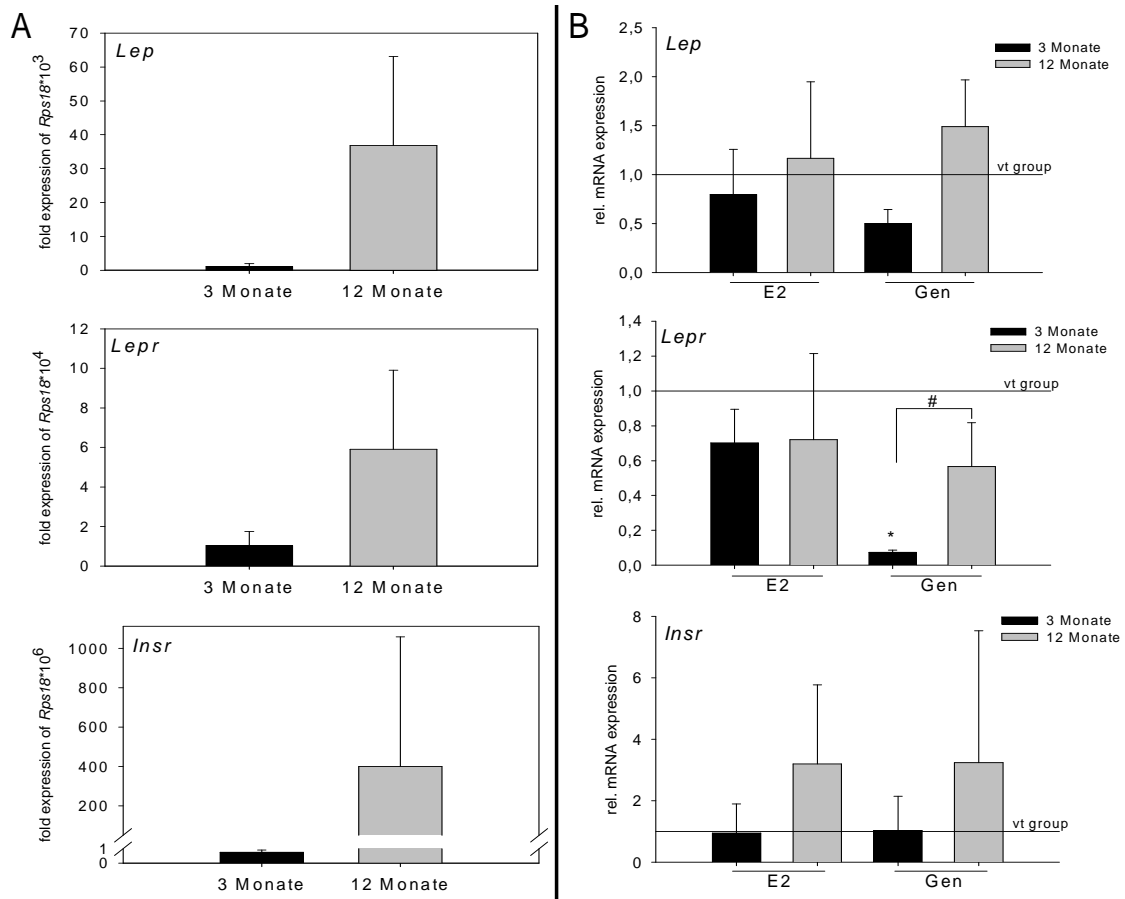


Abb. 4. 21 Expression der Gene mit Verbindung zur Pathogenese des MetS im infrarenalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Lep*, *Lepr* und *Insr* in E_2 bzw. Genistein (Gen) behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: * $p \leq 0,05$; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: # $p < 0,05$

Nach der Behandlung mit E_2 bzw. Genistein konnte für *Lep* und *Insr* altersabhängig eine Umkehrung der östrogenen Regulation der mRNA-Expression beobachtet werden. Dabei zeigt die Expression von *Lep* im infrarenalen Fettgewebe drei als auch zwölf Monate alter Tiere nach der E_2 -Behandlung keine biologisch relevante Veränderung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auffällig ist, dass im infrarenalen Fettgewebe der zwölf Monate alten

Tiere beider Behandlungen eine 1,5-fach höhere Expression des *Lep* als bei den drei Monate alten Tieren vorlag (Abb. 4.21 (B)). Die relative Expression des *Insr* im infrarenalen Fettgewebe ist in beiden Behandlungsgruppen der drei Monate alten ArKO-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert. Wohl aber zeigte sich im infrarenalen Fettgewebe der zwölf Monate alten Tiere für beide Behandlungsgruppen eine 3-fach höhere Expression des *Insr* im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.21 (B)). Die E_2 -Behandlung resultiert für den *Lep* in beiden Altersgruppen in keiner Veränderung der mRNA-Spiegel im infrarenalen Fettgewebe verglichen zu den Kontrolltieren. Eine Abhängigkeit der Regulation der Expression des *Lep* konnte nach der Behandlung mit Genistein gezeigt werden. Das infrarenale Fettgewebe beider Altersgruppen zeigte eine verringerte Expression der *Lep* mRNA nach der Genisteinbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren, aber die mRNA dieses Gens im infrarenalen Fettgewebe drei Monate alter Tiere wurde um das 6-fache niedriger exprimiert als die im entsprechenden Gewebe zwölf Monate alter ArKO-Mäuse.

Bei der Betrachtung des mRNA-Expressionsprofils für *Pparg* konnte gezeigt werden, dass es keine Altersunterschiede in der basalen Expression nachzuweisen war (Abb. 4.22 (A)). Die basale Expression von *Il6* und *Tnfa* hingegen zeigt eine höhere Expression in den drei Monate alten ArKO-Mäusen verglichen zu den zwölf Monate alten Tieren. Dabei war die mRNA-Expression von *Il6* um das 5-fache, die von *Tnfa* um das 7-fache höher (Abb. 4.22 (A)).

Nach der Behandlung mit E_2 konnte für *Pparg* in beiden Altersgruppen eine signifikant um das 2,5-fach verringerte Expression der mRNA im infrarenalen Fettgewebe nachgewiesen werden. Eine Altersabhängigkeit der Regulation der Behandlung mit Genistein wurde für *Pparg* beobachtet, dabei zeigten die zwölf Monate alten ArKO-Mäuse eine signifikant um das 4,5-fache höhere Expression der *Pparg* mRNA im infrarenalen Fettgewebe als die drei Monate alten Tiere (Abb. 4.22 (B)).

Eine Altersabhängigkeit der Regulation der mRNA-Expression im infrarenalen Fettgewebe konnte für das Gen *Il6* für beide Behandlungsgruppen gezeigt werden. Nach der E_2 -Behandlung konnte eine Umkehrung des Regulationsmusters zwischen den beiden

Altersgruppen zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Dabei wiesen die drei Monate alten Tiere nach der E₂-Behandlung eine 3-fach höhere Expression der mRNA des *Il6* als die zwölf Monate alten Tiere aus (Abb. 4.22 (B)). Auch für die Behandlung mit Genistein zeigte sich für die mRNA-Expression des *Il6* eine Altersabhängigkeit der Regulation im infrarenalen Fettgewebe. Zwar wurde für beide Altersgruppen eine verringerte mRNA-Expression des *Il6* im infrarenalen Fettgewebes festgestellt, aber die drei Monate alten Tiere zeigten nach Behandlung eine 9-fach niedrigere Expressionsrate als die zwölf Monate alten Mäuse.

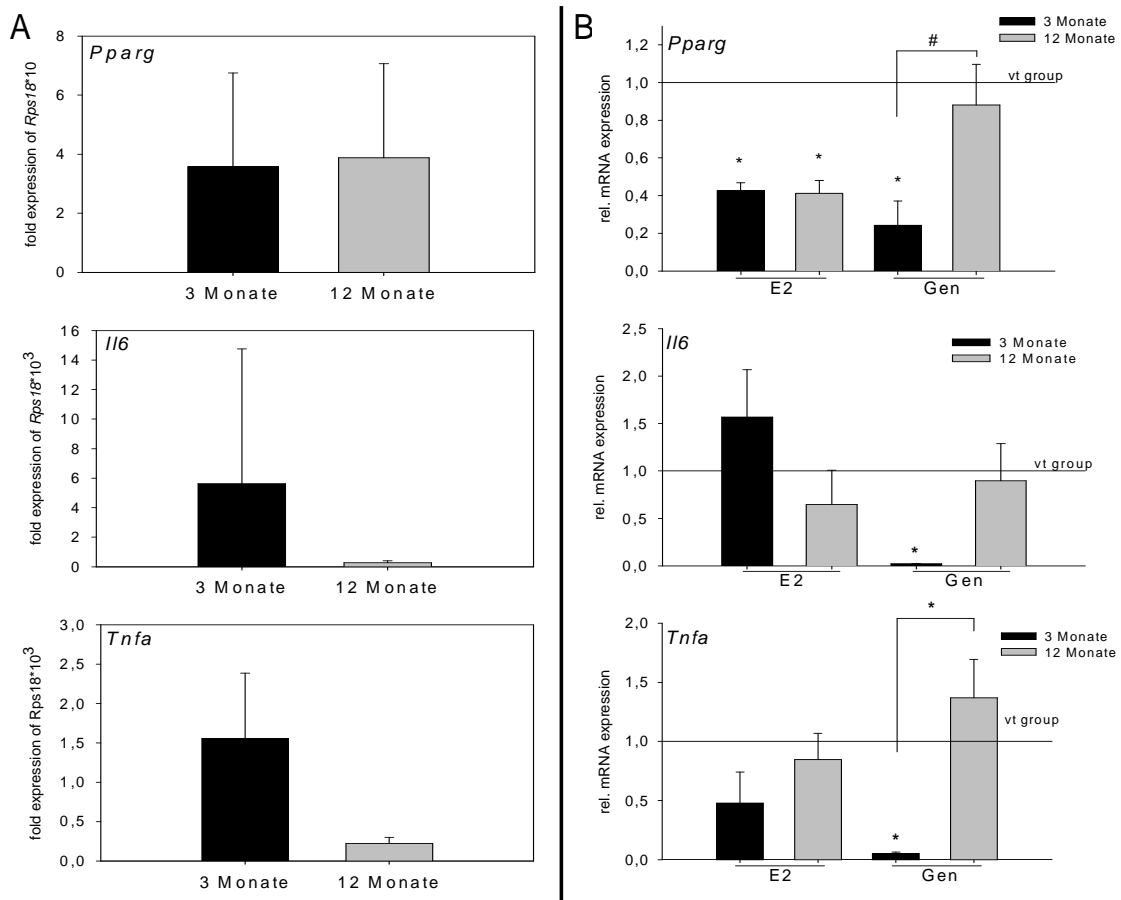


Abb. 4. 22 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe

(A) Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der vehicle-behandelten Tiere im Alter von drei bzw. zwölf Monaten. (B) Vergleich der mRNA-Expression von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* in E₂ bzw. Genistein behandelten Tieren im Alter von drei bzw. zwölf Monaten und vehicle-behandelten Tieren. Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung. Bezogen auf vt ArKO: *p<0,05; bezogen auf die drei Monate alten ArKO-Mäuse: #p<0,05

Auch für die relative Expression des *Tnfa* nach Substanzbehandlung konnte eine Altersabhängigkeit der Regulation nachgewiesen werden. Eine verringerte Expression der mRNA von *Tnfa* konnte nach der E₂-Behandlung im infrarenalen Fettgewebe beider Altersgruppen beobachtet werden. Dabei zeigte sich in der Gruppe der drei Monate alten ArKO-Mäuse eine 1,6-fach niedrigere mRNA-Expression von *Tnfa* als die zwölf Monate alten Tiere. Die Genisteinbehandlung resultierte altersabhängig betrachtet in einer Umkehrung des Regulationsmusters des *Tnfa*. In diesem Fall war die mRNA von *Tnfa* in den drei Monate alten Tieren um das 10-fache herunterreguliert worden, aber in den zwölf Monate alten Tieren um das 1,2-fache höher exprimiert gefunden im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.22 (B)).

4.3 Prüfung der östrogenen Wirksamkeit nach einer Kurzzeitbehandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3)

Mittels der tierexperimentellen Studie TV 3 sollte geprüft werden, welchen Einfluss eine dreitägige Gabe von östrogenähnlichen Substanzen wie Raloxifen, Genistein und 8-PN auf die ausgewählten Zielorgane Uterus sowie gonadales und infrarenales Fettgewebe haben. Für den TV 3 wurden weibliche ArKO-Mäuse für drei Tage subkutan mit Östrogen und östrogenähnlichen Substanzen behandelt (Tab. 3.4). Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben fand auch eine Antagonisierung der E₂-Behandlung mit dem Antiöstrogen Fulvestrant statt. Aufgrund der Ergebnisse musste allerdings davon ausgegangen werden, dass die Antagonisierung ohne Erfolg blieb. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die Darstellung der Antagonisierungsergebnisse verzichtet.

4.3.1 Physiologische und biochemische Parameter nach dreitägiger Behandlung mit östrogenähnlichen Substanzen

Mit der Bestimmung der physiologischen und biochemischen Parameter sollte vergleichend geprüft werden, welchen Einfluss die Gabe von östrogenähnlichen Substanzen im Vergleich zu Östradiol auf ausgewählte Untersuchungsparameter in ArKO-Mäusen hat.

4.3.1.1 Einfluss der Behandlung auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen

Wie aus Abbildung 4.23 entnommen werden kann, gab es vergleichend zwischen den kontroll- und den E₂-behandelten Mäusen keine signifikanten Unterschiede das Körpergewicht betreffend.

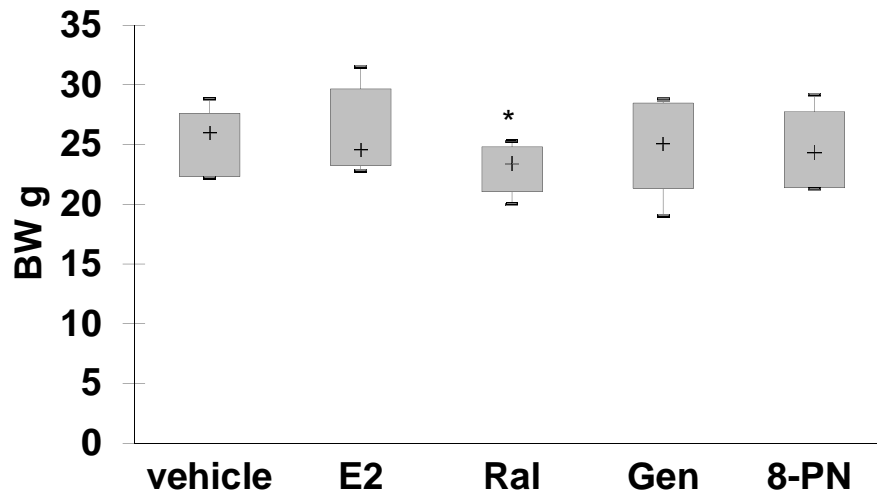


Abb. 4. 23 Körpergewicht (BW)

Dargestellt ist das Körpergewicht der ArKO-Mäuse infolge einer subkutanen Applikation von *vehicle*, E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) bzw. 8-Prenylnaringenin (8-PN) während eines uterotrophen Assay. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. *p ≤ 0,05 bezogen auf *vehicle*

Die einzige signifikante Veränderung des Körpergewichtes war eine Verringerung in der mit Raloxifen behandelten Gruppe. Die mit Genistein und 8-PN behandelten Tiere zeigten keine Veränderung des Körpergewichtes verglichen mit den kontrollbehandelten ArKO-Mäusen.

4.3.1.2 Einfluss der Behandlung auf das Uterusfeuchtgewicht von ArKO-Mäusen

Nach einer dreitägigen Behandlung mit E₂ zeigen die ArKO-Mäuse ein 6-fach signifikant schwereres Uterusfeuchtgewicht verglichen mit kontrollbehandelten Mäusen (Abb. 4.24). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das Uterusfeuchtgewicht nach einer Behandlung mit Raloxifen (2,2-fach) und 8-PN (2-fach) ebenfalls signifikant erhöht ist verglichen zu der kontrollbehandelten Gruppe (Abb. 4.24). Lediglich nach der

Behandlung mit Genistein konnte keine Veränderung des relativen Uterusfeuchtgewichts verglichen mit der kontrollbehandelten Gruppe gezeigt werden.

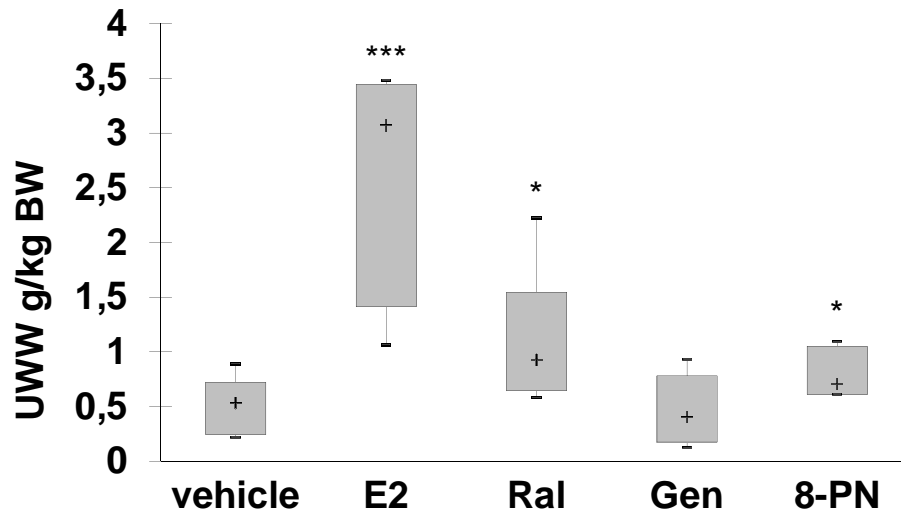


Abb. 4. 24 Uterusfeuchtgewicht (UWW)

Dargestellt ist das Uterusgewicht der ArKO-Mäuse nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3.3. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ bezogen auf vehicle

4.3.1.3 Einfluss der Behandlung auf das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen

Eine dreitägige Behandlung mit E_2 hat auf das infrarenale Fettgewebe im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren keinen signifikanten Einfluss (Abb. 4.25).

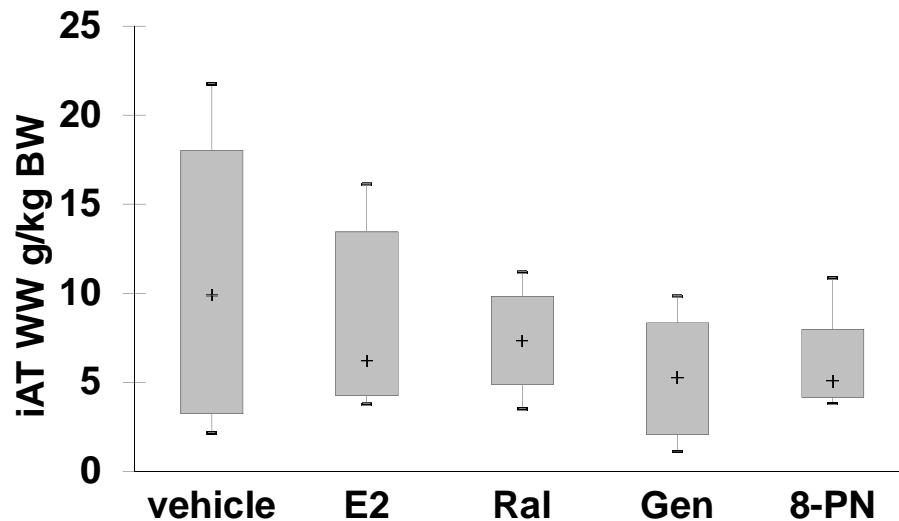


Abb. 4. 25 Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (iAT WW)

Dargestellt ist das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes der ArKO- Mäuse nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 3. Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte.

4.3.1.4 Einfluss der Behandlung auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen

Mit der Bestimmung des Serumleptin-Spiegels besteht unter anderem die Möglichkeit zu sehen welchen Einfluss die Testsubstanzen auf den Energiestatus der ArKO-Mäuse haben.

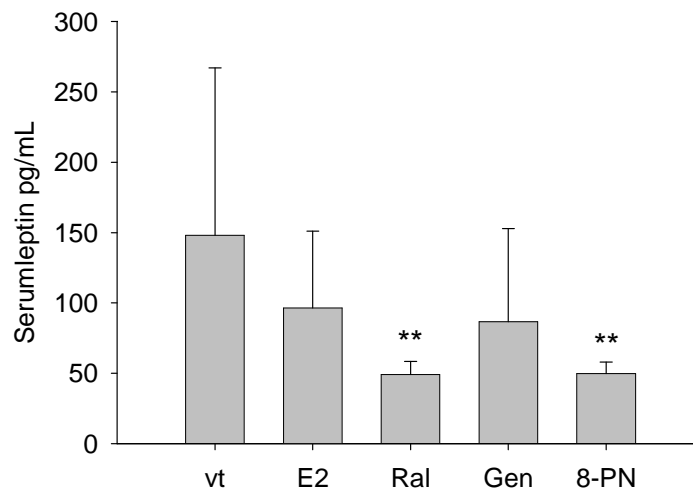


Abb. 4. 26 Serumleptin – Konzentration in pg/mL

Dargestellt ist die Serumleptin-Konzentration der ArKO- Mäuse nach einem uterotrophen Assay gemäß Tab. 3. 3. Der Box Plot zeigt die 10% und 90% Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte. ** $p \leq 0,01$ bezogen auf vehicle

Der Serumleptin-Spiegel liegt im Trend niedriger nach der E₂-Behandlung verglichen mit den kontrollbehandelten Tieren, diese Beobachtung ist allerdings nicht signifikant (Abb. 4.26). Die Raloxifen- und die 8-PN-Behandlung resultierten jeweils in einem 3-fach signifikant geringerem Serumleptin-Spiegel verglichen mit den kontrollbehandelten Tieren. Eine nicht signifikante Verringerung des Serumleptin-Spiegels wurde nach der Behandlung mit Genistein im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren beobachtet (Abb. 4.26).

4.3.1.5 Einfluss der Behandlung auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen

Der Plasmaglukose-Spiegel zeigte keine signifikante Veränderung in der E₂-supplementierten Gruppe im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren. Auch bei den mit den östrogenähnlichen Substanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN behandelten Gruppen wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Einfluss der dreitägigen Behandlung auf die Genexpression der ArKO-Maus

Mittels Genexpressionsanalyse wurde überprüft, ob sich behandlungsbedingte Veränderungen, welche bereits auf physiologischer und biochemischer Ebene beobachtet wurden, bekräftigen lassen.

4.3.2.1 Uterus

Nach der E₂-Behandlung der ArKO-Mäuse konnte eine erhöhte Expression des *Esr1* und *Esr2* festgestellt werden (Abb. 4.27). Dabei wurde der *Esr1* mRNA-Spiegel nach der E₂-Behandlung um das 2,5-fache höher exprimiert als in den Kontrolltieren.

Nach der Genisteinbehandlung kam es zu keiner Expressionsänderung von *Esr1* und *Esr2* (Abb. 4.27). Die Raloxifenbehandlung führte zu einer 2-fach höheren mRNA-Expression von *Esr1* und *Esr2* verglichen zu den Spiegeln in den Kontrolltieren. Ebenso resultierte die 8-PN-Behandlung in einer erhöhten Expression von *Esr1* (3-fach) und *Esr2* (6-fach) verglichen mit den Kontrolltieren.

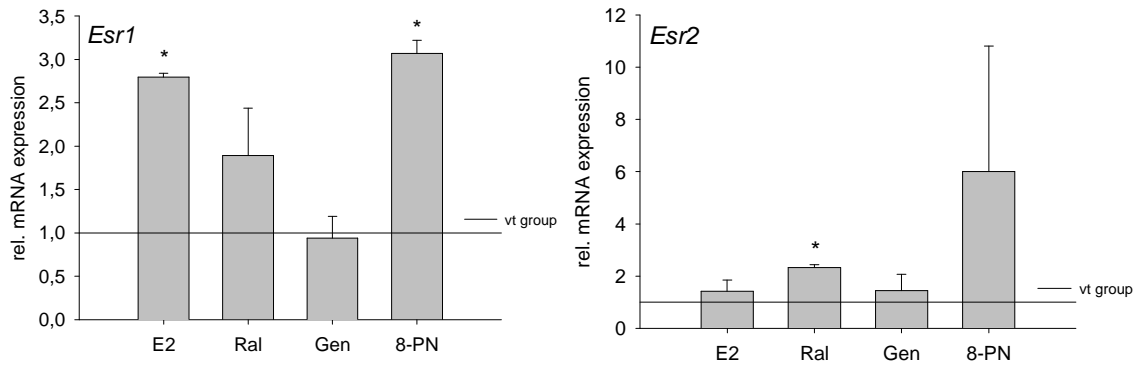


Abb. 4. 27 Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Esr1* und *Esr2* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Eine erhöhte mRNA-Expression nach der E₂-Behandlung wurde für die Genen *Pgr* (1,5-fach), *Clu* (1,5-fach) und *Ltf* (3-fach) nachgewiesen verglichen mit den uterinen mRNA-Spiegeln in den Kontrolltieren (Abb. 4.28).

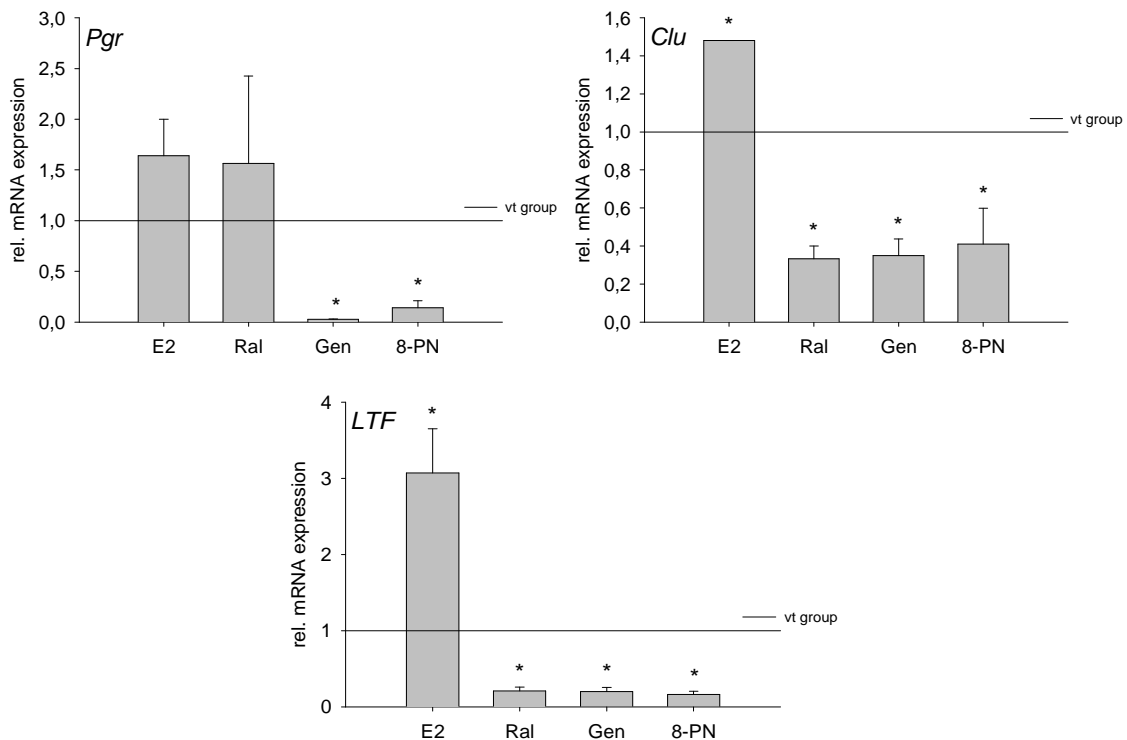


Abb. 4. 28 Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pgr*, *Clu* und *Ltf* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Nach der Behandlung mit Raloxifen konnte eine 1,5-fach erhöhte Expression der mRNA des *Pgr* nachgewiesen werden, welche aber nicht signifikant ist, während eine signifikant verringerte Expressionsrate nach Behandlung mit Genistein (10-fach) bzw. 8-PN (5-fach) nachgewiesen werden konnte im Vergleich zu der kontrollbehandelten Gruppe. Die Gene *Ltf* und *Clu* wiesen beide in den Behandlungsgruppen Raloxifen, Genistein und 8-PN einen bis zu 5-fach signifikant niedrigeren mRNA-Expressionsspiegel gegenüber der Kontrollgruppe auf (Abb. 4.28).

Die Gene *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* wurden als mögliche molekulare Verbindung zwischen dem MetS und der Östrogendefizienz ausgewählt.

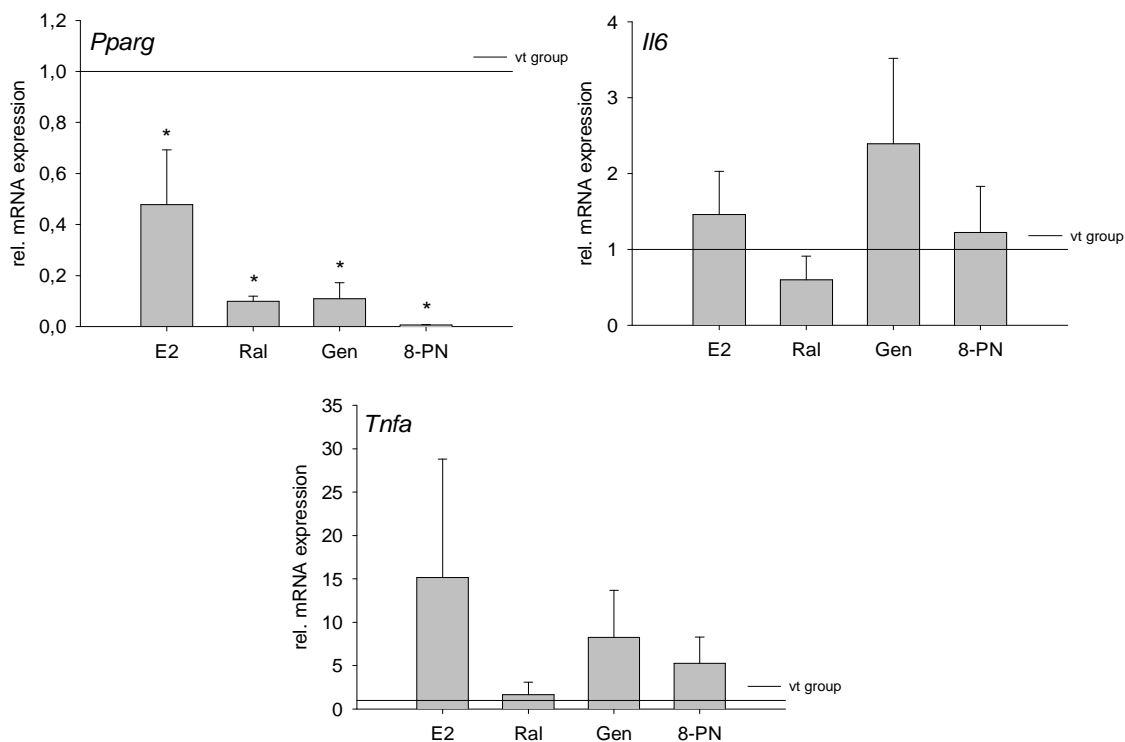


Abb. 4. 29 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Die mRNA-Expression des *Pparg* zeigte in allen Behandlungsgruppen eine signifikant niedrigere Expression verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 4.30.). Die E_2 -Behandlung resultiert für die *Pparg* mRNA in einer 2-fach niedrigeren, die Raloxifen- und Genisteinbehandlung in einer 10-fach niedrigeren und die 8-PN-Behandlung in einer 20-fach niedrigen Expression verglichen mit den Kontrolltieren. Für das Gen *Il6* konnte nur nach der Behandlung mit Genistein eine 2-fach erhöhte mRNA-Expression gezeigt werden, alle anderen Behandlungen führten zu keiner veränderten Regulation der Expression gegenüber den Kontrolltieren. Die Tiere der Behandlungsgruppen Raloxifen, Genistein und 8-PN zeigten eine höhere Expression der *Tnfa* mRNA im Uterus auf verglichen mit den kontrollbehandelten Tieren. Allerdings war keine dieser Beobachtungen signifikant, obwohl für die E_2 -behandelten Tiere eine 15-fach erhöhte und für die Genistein bzw. Raloxifen behandelten eine um 5-fach erhöhte mRNA-Expression von *Tnfa* gezeigt werden konnte.

4.3.2.2 Gonadales Fettgewebe

Eine phänotypische Charakteristik der ArKO-Maus ist die signifikante erhöhte Fettmasse. So war es im TV 3 von Interesse, welchen Einfluss eine Kurzzeitbehandlung mit Östrogen und östrogenähnlichen Substanzen auf die Genexpression des gonadalen Fettgewebes der ArKO-Maus hat.

Es zeigte sich nach der E_2 -Behandlung, dass der *Esr1* im gonadalen Fettgewebe nicht durch E_2 reguliert wurde, der *Esr2* aber nach der E_2 -behandlung 2,5-fach signifikant niedriger Expression aufwies als in der kontrollbehandelten Gruppe (Abb. 4.30).

Nach der Behandlung mit Raloxifen konnte eine um das 2-fache niedrigere mRNA-Expression gezeigt werden, jeweils im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Behandlung mit Genistein zeigte verglichen mit der Kontrolle für beide Steroidrezeptoren eine 1,5-fache Erhöhung der Expression im gonadalen Fettgewebe. Nach der Behandlung mit 8-PN wurde keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression des *Esr1*, allerdings eine 2-fach geringere Expression des *Esr2* im Vergleich zu der kontrollbehandelten Gruppe nachgewiesen (Abb. 4.30).

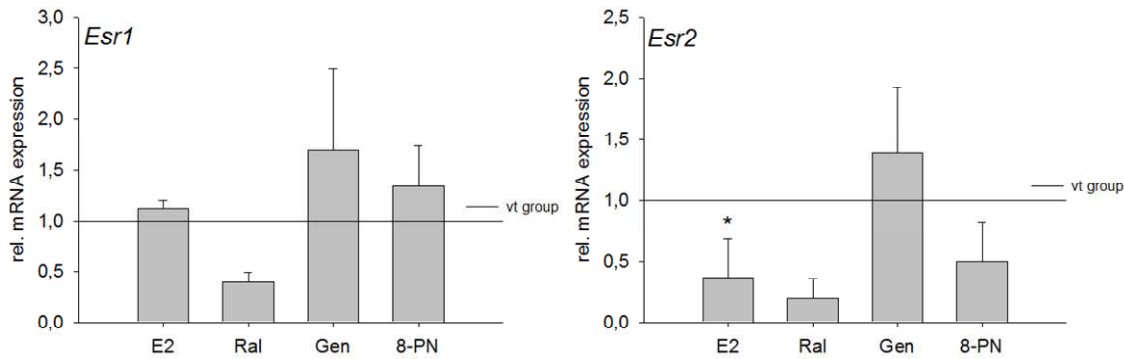


Abb. 4.30 Expression der Östrogenrezeptoren im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Esr1* und *Esr2* nach der Behandlung mit E_2 , Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

Das als Indikator für Östrogenresponsivität bekannte Gen *Clu* zeigte nach der Verabreichung mit E_2 keine Veränderung der Regulation der Expression im gonadalen Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.31). Die Behandlung mit Raloxifen zeigte eine 3-fach verringerte Expression der *Clu* mRNA verglichen zur Kontrollgruppe. Nach der Gabe mit Genistein konnte kein Unterschied in der Expression für *Clu* festgestellt werden, während aber die Behandlung mit 8-PN zu einer 1,2-fach signifikant erhöhten Expression des *Clu* im gonadalen Fettgewebe führte.

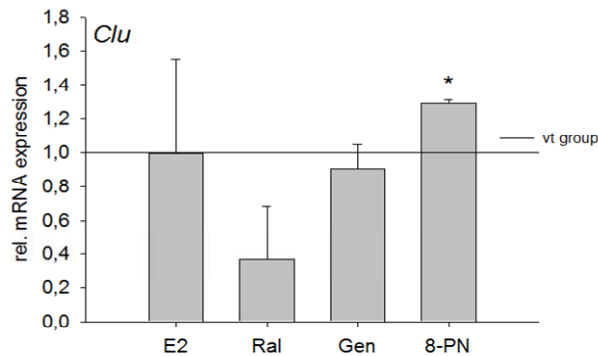


Abb. 4.31 Expression des *Clu* im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Clu* nach der Behandlung mit E_2 , Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression des *Clu* ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

Die Gene *Lep*, *Lepr* und *Insr* sind Indikatoren, welche für die Entstehung des MetS verwendet werden können.

Die E₂-Behandlung wirkt sich im gonadalen Fettgewebe auf die Expression durch eine Erhöhung der mRNA der Gene *Lep* (5-fach) und *Lepr* (2-fach) aus sowie eine Verringerung der *Insr* mRNA (2-fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.32).

Nach der Gabe von Raloxifen, Genistein und 8-PN konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren für die Gene *Lep* und *Lepr* ein erhöhtes Expressionsniveau im gonadalen Fettgewebe beobachtet werden. Die erhöhte mRNA-Expression des *Lep* war bei den Behandlungsgruppen Genistein (35-fach) und 8-PN (30-fach) signifikant. Ebenso signifikant war die erhöhte Expression der *Lepr* mRNA nach der Verabreichung mit Genistein (4-fach) und 8-PN (2-fach). Für den *Insr* zeigte sich eine 2,5-fach verringerte Expression nach der E₂-Behandlung und ein signifikant 5-fach niedrigerer mRNA-Spiegel nach der Behandlung mit Genistein verglichen mit den Kontrolltieren. Die anderen Behandlungsgruppen zeigten keine regulatorischen Effekte auf den *Insr*.

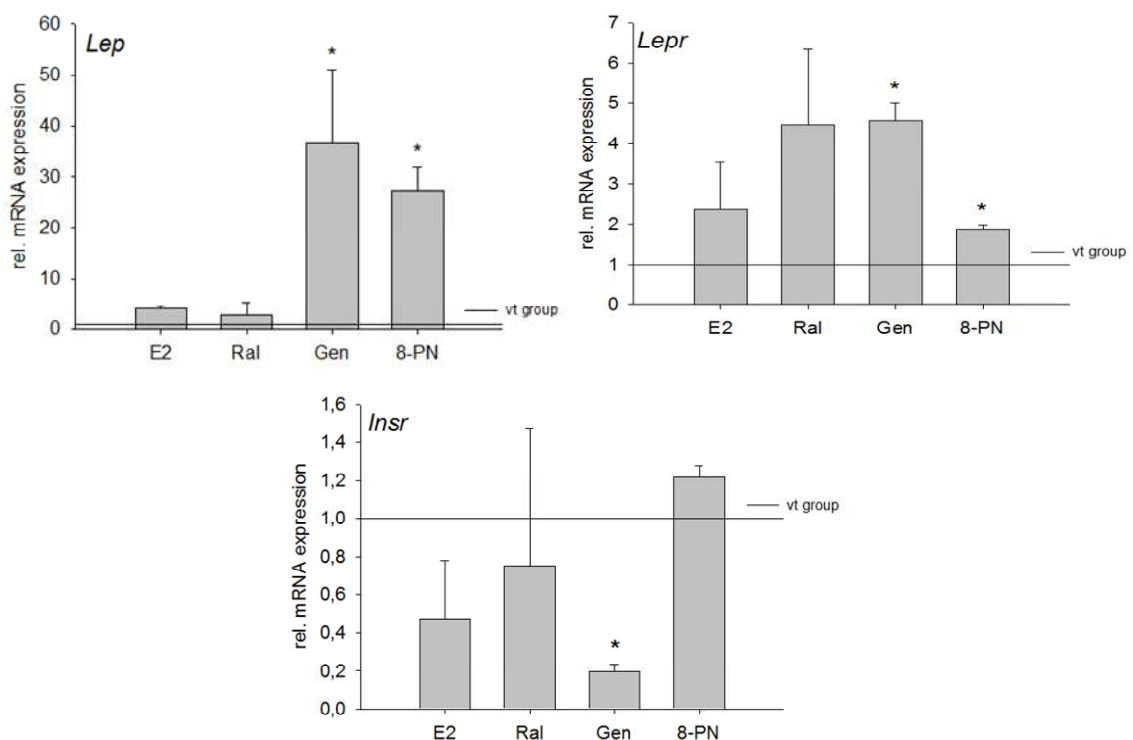


Abb. 4. 32 Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr* und *Insr* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

Im gonadalen Fettgewebe konnte für das Gen *Pparg* nach der E₂- wie auch nach der Raloxifenbehandlung kein Einfluss auf die Expressionsspiegel verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 4.33) beobachtet werden. Die Behandlung mit Genistein resultierte im Vergleich zu den Kontrolltieren in einer 1,4-fach höheren, die Behandlung mit 8-PN in einer 2-fach verringerten mRNA-Expression von *Pparg*.

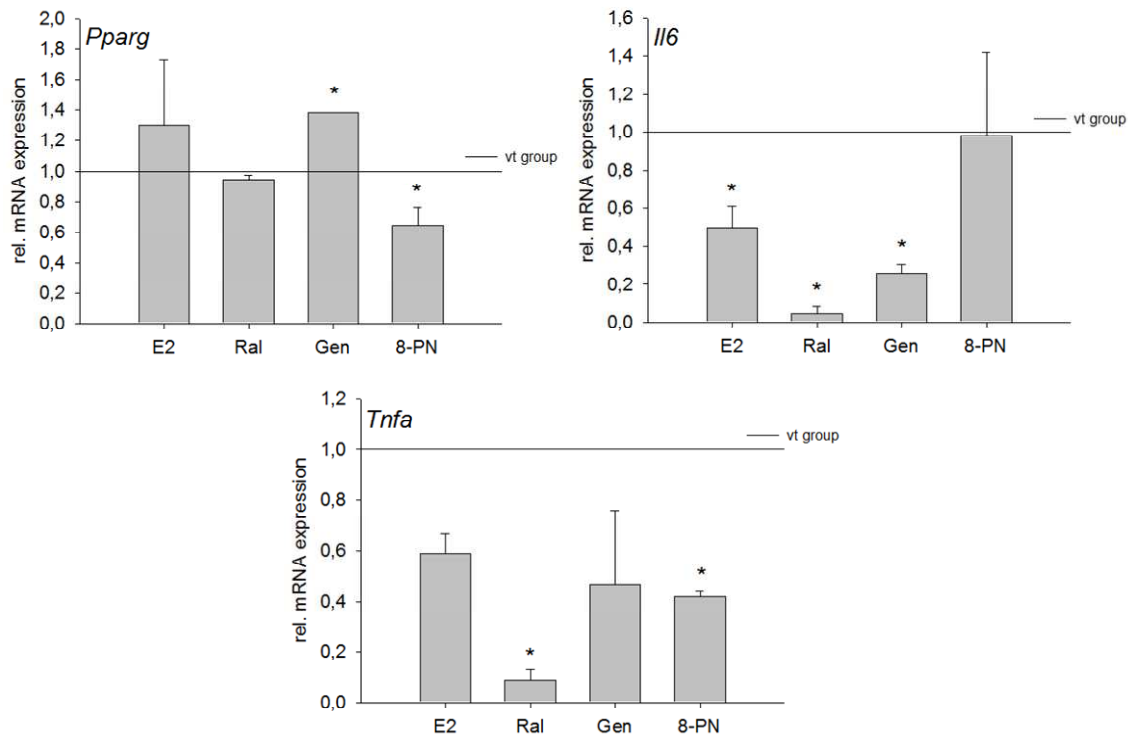


Abb. 4.33 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

Die Gene *Il6* und *Tnfa* hingegen wiesen beide einen 2-fach verminderten relativen Expressionsspiegel nach der E₂-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 4.33). Die mRNA-Expression des *Il6* war nach der Gabe mit Raloxifen um das 10-fache und nach der Behandlung mit Genistein um das 5-fache niedriger exprimiert als bei den Kontrolltieren. Keine veränderte Expression des *Il6* zeigte sich nach der 8-PN-Behandlung. Auch die *Tnfa* mRNA wies nach der Verabreichung mit Raloxifen eine 10-fache signifikant

verringerte und nach der Behandlung mit 8-PN eine signifikant 2,5-fach verringerte Expressionsrate aus verglichen mit den Kontrolltieren. Kein verändertes Expressionsmuster zeigte sich nach der Behandlung mit E₂ und Genistein für den *Tnfa*.

4.3.2.3 Infrarenales Fettgewebe

Die Behandlung mit Östrogen bzw. östrogenähnlichen Substanzen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe bei der mRNA-Expression des *Esr1* lediglich nach der Raloxifenbehandlung eine signifikant 5-fach verringerte Expression im infrarenalen Fettgewebe (Abb. 4.34). Die relative Expression der mRNA des *Esr2* war bei allen Behandlungsgruppen verringert. Dabei wurde die mRNA-Expression des *Esr2* signifikant nach der Behandlung mit E₂ (5-fach) und 10-fach nach der Behandlung mit Genistein und 8-PN verringert verglichen mit den Kontrolltieren (Abb. 4.34).

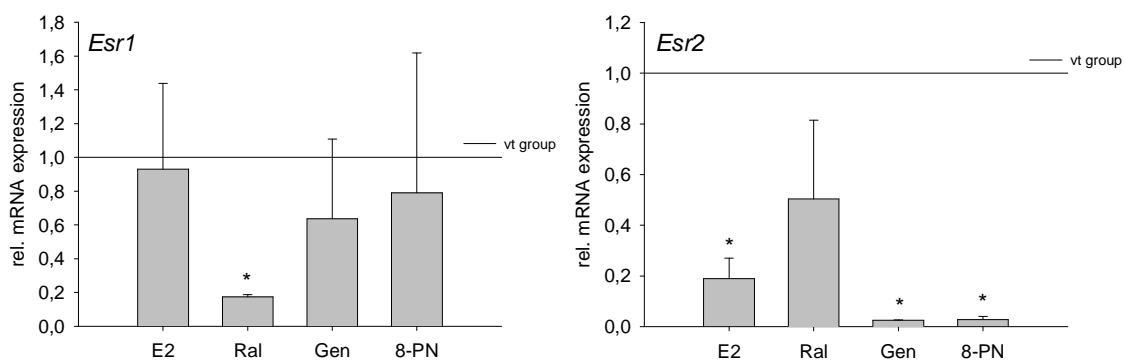


Abb. 4. 34 Expression der Östrogenrezeptoren im infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Esr1* und *Esr2* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die *vehicle* behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Für das östrogensensitive Markergen *Clu* wurde nach der Behandlung mit E₂ keine Regulation der Expression der mRNA im infrarenalen Fettgewebe verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 4.35). Eine signifikant verringerte Expressionsrate konnte für *Clu* nach der Behandlung mit Raloxifen (10-fach) und Genistein (2,5-fach) festgestellt werden. Eine Behandlung mit 8-PN zeigte im Vergleich zu den

kontrollbehandelten Tieren keine veränderte Expression im infrarenalen Fettgewebe für die mRNA des *Clu*.

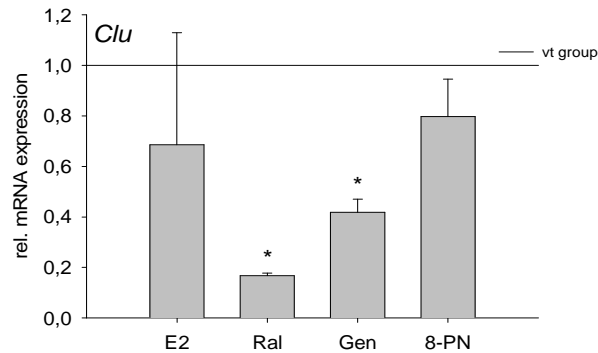


Abb. 4.35 Indikator der Östrogenresponsivität im infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Clu* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Alle Gene sind normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Die Gabe von E₂ zeigte in den Genen *Lep*, *Lepr* und *Insr* kein verändertes Expressionsverhalten im infrarenalen Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.36).

Nach der Behandlung mit Raloxifen wurde verglichen zu den Kontrolltieren für *Lep* eine 5-fach verringerte und für den *Insr* eine 15-fach erhöhte Expression im infrarenalen Fettgewebe beobachtet (Abb. 4.36). Die Behandlungsgruppe von Genistein bzw. 8-PN zeigte im infrarenalen Fettgewebe nur in der *Lepr* Expression eine signifikante Veränderung dahingehend, dass eine 10-fach verringerte Expression stattfand verglichen mit den Kontrolltieren.

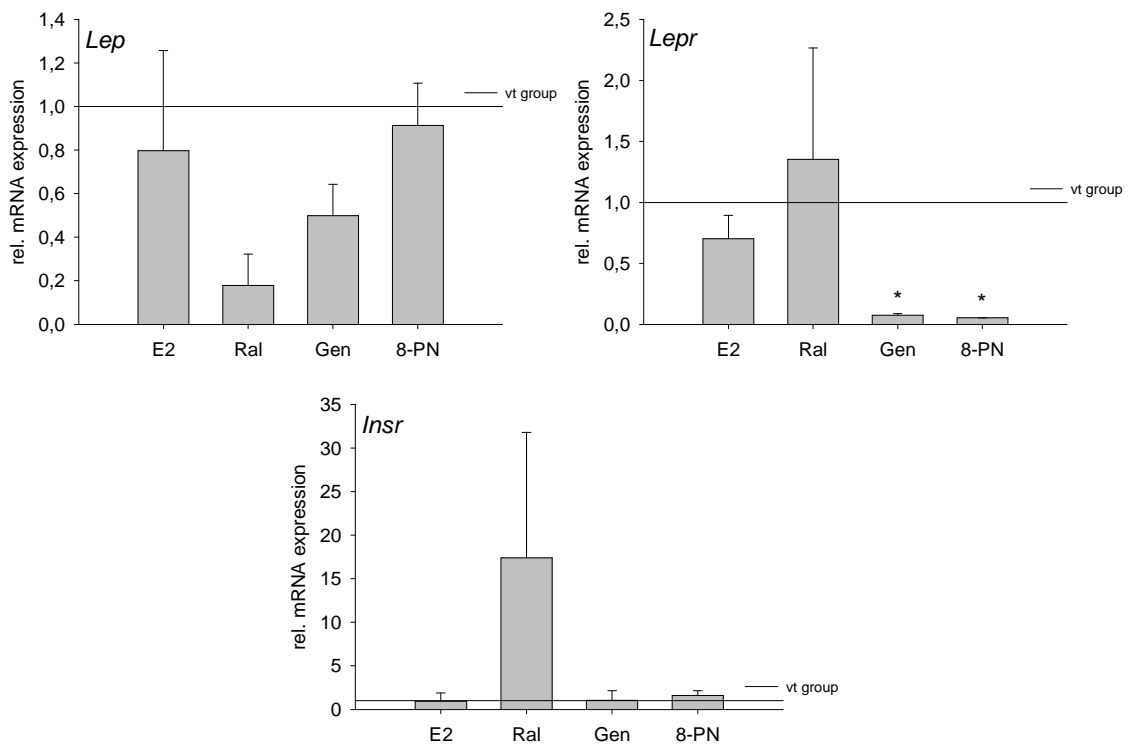


Abb. 4. 36 Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind im, infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr* und *Insr* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Für die Gene, die eine molekulare Verbindung zwischen dem MetS und der Östrogendefizienz darstellen, wurde nach der Gabe von E₂ festgestellt, dass *Pparg* eine 2,5-fache und *Il6ra* sowie *Tnfa* eine 5-fache niedrigere Expressionsrate im infrarenalen Fettgewebe aufwiesen (Abb. 4.37). Das Gen *Il6* hingegen zeigte keine Veränderung im Regulationsverhalten bezogen auf die kontrollbehandelten Tiere (Abb. 4.37).

Nach der Raloxifenbehandlung zeigten sich für *Il6* mRNA eine signifikant 10-fach verringerte Expression und eine 2,5-fach verringerte Expression für die Gene *Il6ra* und *Tnfa* jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Genistein resultierte für alle vier Gene in einer signifikanten Herunterregulation der Expression. Dabei wurden *Pparg* um das 5-fache und *Il6*, *Il6ra* und *Tnfa* um das 10-fache geringer exprimiert als bei den Kontrolltieren. Eine 10-fach signifikant verringerte Expression der mRNA konnte für

die Gene *Pparg*, *Il6* und *Tnfa* nach der Behandlung mit 8-PN gezeigt werden im Vergleich zu den Kontrolltieren.

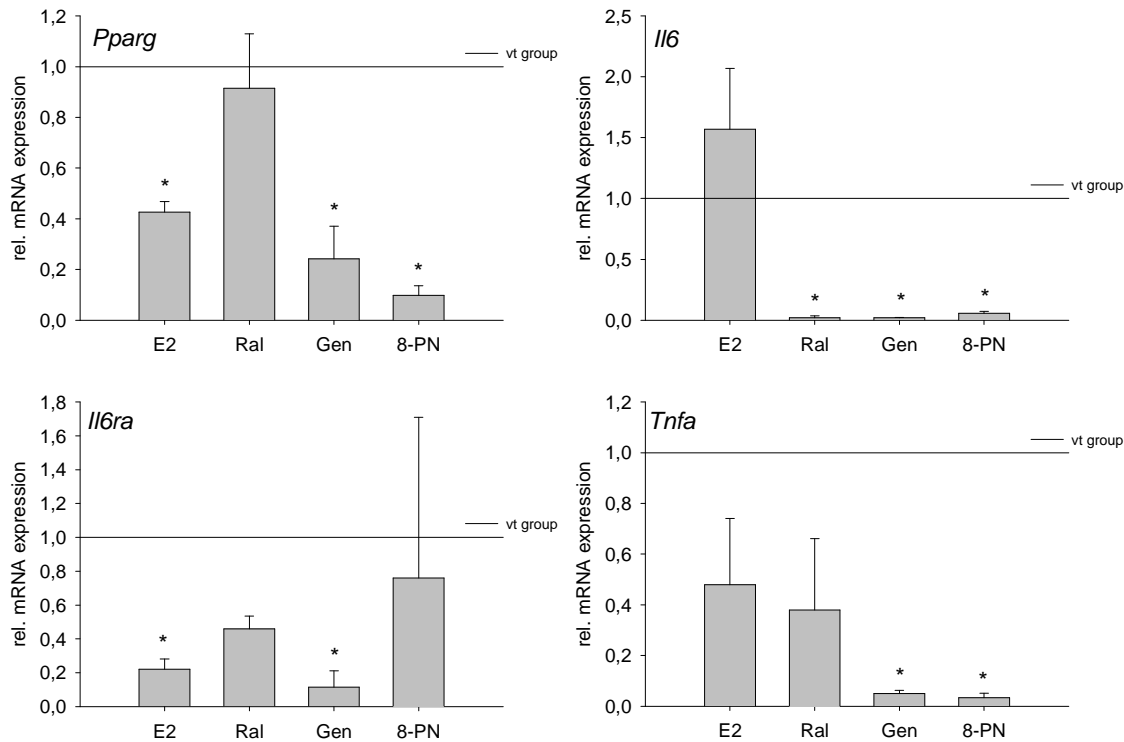


Abb. 4.37 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr* und *Insr* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

4.4 Prüfung der östrogenen Wirksamkeit nach einer Langzeitbehandlung mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 4)

Nachdem in TV 3 der Einfluss über eine Behandlungsdauer von drei Tagen geprüft wurde, sollte nun mit der vierten tierexperimentellen Studie (TV 4) beobachtet werden, welchen Einfluss eine 21-tägige Behandlung mit östrogenähnlichen Substanzen wie Raloxifen, Genistein und 8-PN auf die ausgewählten Zielorgane Uterus sowie gonadales und infrarenales Fettgewebe haben. Im TV 4 lag allerdings der Fokus diesmal auf der Aufklärung sich langsamer entwickelnder Effekte, die sich erst durch eine längere Gabe von SERM und sekundärer Pflanzenstoffe mit östrogenen Aktivität durch Änderungen des

Phänotyp hinsichtlich Glucose- und Lipidhomöostase äußern. Im TV 4 wurden die weiblichen ArKO-Mäuse mittels eines Silikonpellets für 21 Tage einer östrogenen Exposition ausgesetzt.

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben wurde parallel ein Experiment zur Antagonisierung der Wirksamkeit der östrogenen Substanzen angesetzt. Aufgrund der Ergebnisse musste aber davon ausgegangen werden, dass die Antagonisierung nicht ausreichend war. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die Darstellung der Antagonisierungsergebnisse verzichtet.

4.4.1 Einfluss der Langzeitexposition auf physiologische und biochemische Parameter

Eine längerfristige Exposition mit östrogenen Substanzen sollte auf der Ebene der Physiologie und Biochemie der betrachteten Organsysteme Uterus, als Vertreter der Reproduktionsorgane und Fettgewebe als Organ des Energiestoffwechsels, sichtbar sein.

4.4.1.1 Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Körpergewicht von ArKO-Mäusen

Das Körpergewicht betreffend lässt sich nach einer 21-tägigen Exposition mit E₂ ein 1,3-fach signifikant geringeres Körpergewicht feststellen im Vergleich zur kontrollbehandelten Gruppe. Die Substanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Effekte auf das Körpergewicht (Abb. 4.38).

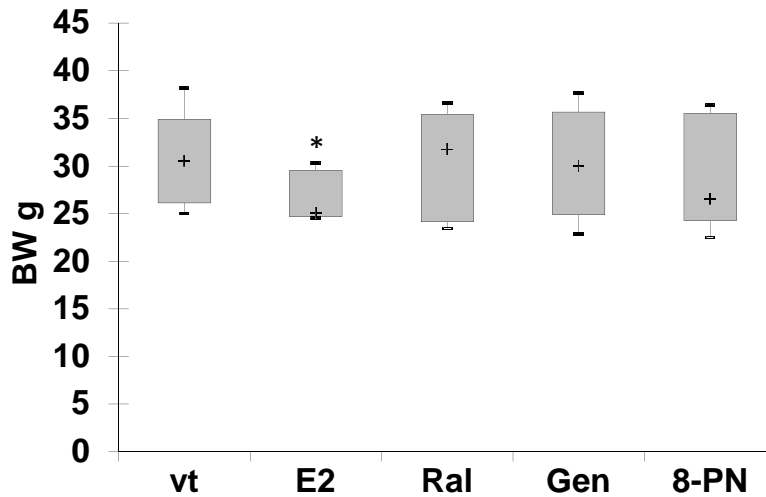


Abb. 4.38 Körpergewicht (BW)

Dargestellt ist das Körpergewicht von ArKO-Mäusen nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantat mit vehicle, E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) bzw. 8-Prenylnaringenin (8-PN). Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte, *p ≤ 0,05

4.4.1.2 Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Uterusfeuchtgewicht von ArKO-Mäusen

Das Uterusfeuchtgewicht war nach der Behandlung mit E₂ erwartungsgemäß signifikant um das 8-fache erhöht (Abb. 4.39).

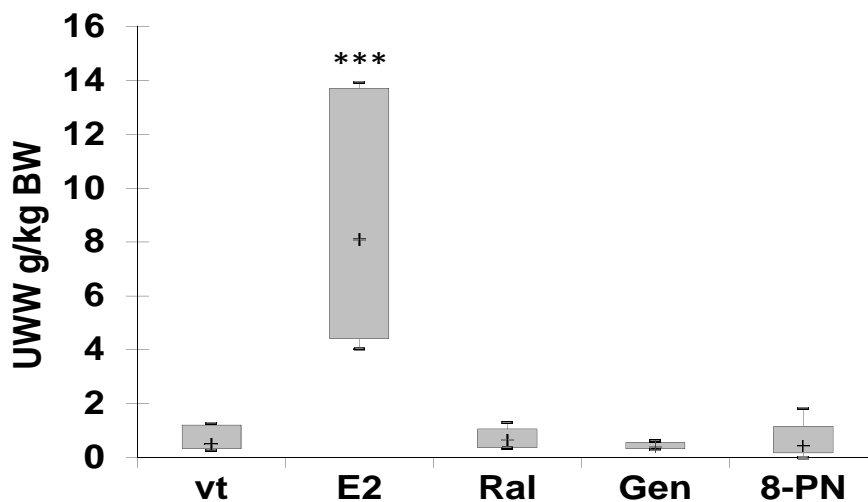


Abb. 4.39 Uterusfeuchtgewicht (UWW)

Dargestellt ist das Uterusgewicht von ArKO-Mäusen nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantat mit vehicle, E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) bzw. 8-Prenylnaringenin (8-PN). Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte, *p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Positivkontrolle erfolgreich verlief. Die Behandlungen mit Raloxifen, Genistein bzw. 8-PN zeigten keine Veränderung im Uterusfeuchtgewicht verglichen mit der kontrollbehandelten Gruppe (Abb. 4.39).

4.4.1.3 Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf das Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen

Die Exposition mit den östrogenen Substanzen führte im infrarenalen Fettgewebe nicht für jede Gruppe zu signifikanten Veränderungen. Es konnte aber gezeigt werden, dass durch die E₂-Behandlung das Fettpolster des infrarenalen Fettgewebes um das 4-fache signifikant leichter war verglichen mit dem der Kontrolltiere (Abb. 4.40). Auch die Behandlungen mit den östrogenen Testsubstanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN zeigten im Trend ein bis zu 2-fach leichteres infrarenales Fettpolster verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 4.40).

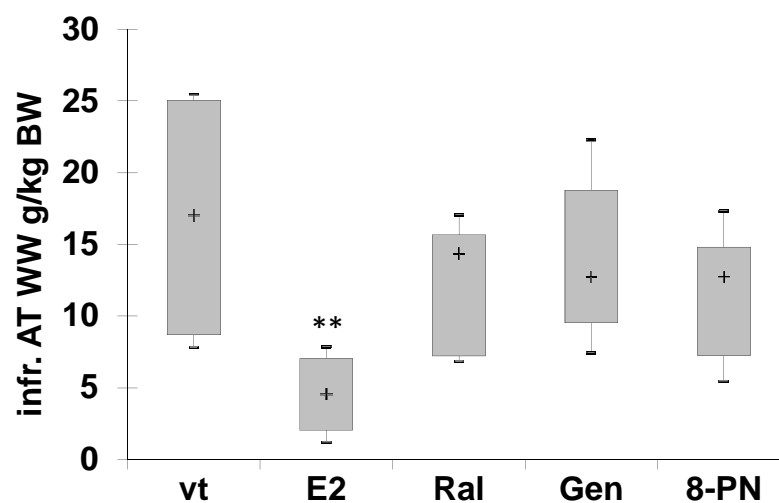


Abb. 4. 40 Feuchtgewicht des infrarenalen Fettgewebes (infr. AT WW)

Dargestellt ist das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes von ArKO-Mäusen nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantat mit *vehicle*, E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) bzw. 8-Prenylningenin (8-PN). Der Box Plot zeigt die 10 % und 90 % Perzentile (Box), den Median (+) sowie die Minimal- und Maximalwerte, *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01

4.4.1.4 Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf den Serumleptin-Spiegel von ArKO-Mäusen

Der Serumleptin-Spiegel dient unter anderem als Marker für Veränderungen, die im Zusammenhang mit der Entstehung des MetS auftreten.

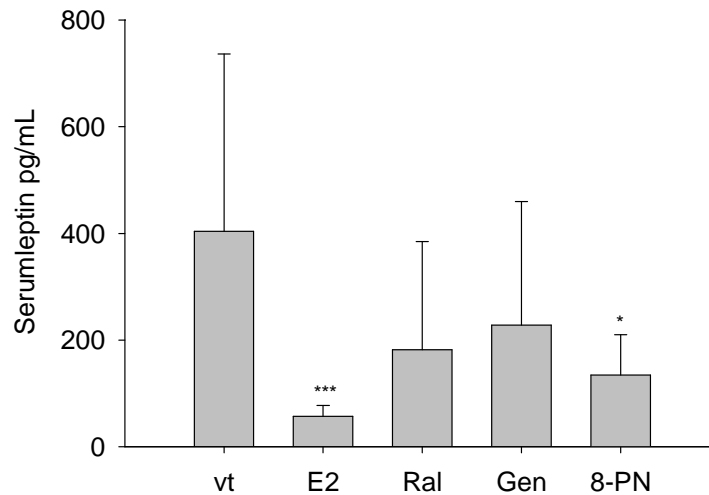


Abb. 4. 41 Serumleptin Konzentration in pg/mL

Dargestellt ist die Serumleptin-Konzentration von ArKO-Mäusen nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantat mit vehicle, E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) bzw. 8-Prenylnaringenin (8-PN). Dargestellt sind die Mittelwerte ±Standardabweichung,

*p ≤ 0,05

Wie in Abbildung 4.41 zu sehen ist, resultierten die Behandlungen mit E₂ (8-fach) und 8-PN (4-fach) in einem signifikant niedrigerem Serumleptin-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe. In den anderen östrogenen Behandlungsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

4.4.1.5 Einfluss einer langfristigen Behandlung mit östrogenen Substanzen auf den Plasmaglukose-Spiegel von ArKO-Mäusen

Der Plasmaglukose-Spiegel gibt Hinweise auf einen eventuell bestehenden *Diabetes mellitus*. Mit dem TV 4 konnte gezeigt werden, dass in keiner der Behandlungsgruppen eine Veränderung hinsichtlich des Plasmaglukose-Spiegels im Vergleich zur Kontrollgruppe induziert wurde (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Einfluss einer langfristigen Behandlung auf die Genexpression der ArKO-Maus

Um die auf Ebene der Physiologie aufgetretenen Veränderungen, wie z. B. keine Veränderung des Uterusgewichtes nach Gabe der Testsubstanzen zu prüfen, sollte die Genexpressionsanalyse auf molekularer Ebene Hinweise dazu bringen.

4.4.2.1 Uterus

Der Einfluss der Behandlung mit E_2 resultiert beim *Esr1* in einer signifikant 5-fach verringerten mRNA-Expression verglichen mit der Kontrollgruppe. Während beim *Esr2* nach einer E_2 -Behandlung keine veränderte Expressionsrate beobachtet wurde (Abb. 4.42). *Esr1* zeigte keine Expressionsveränderung in den Gruppen, welche mit Raloxifen, Genistein oder 8-PN behandelt wurden. Die *Esr2* mRNA hingegen wird nach der Behandlung mit den östrogenen Substanzen in allen drei Gruppen signifikant verringert exprimiert gefunden. Dabei wird der *Esr2* mRNA-Spiegel nach der Behandlung mit Raloxifen signifikant um das 5-fache, nach der Behandlung mit Genistein signifikant um das 2,5-fache und nach der Behandlung mit 8-PN signifikant um das 2-fache herunterreguliert verglichen zu den Kontrolltieren (Abb. 4.42).

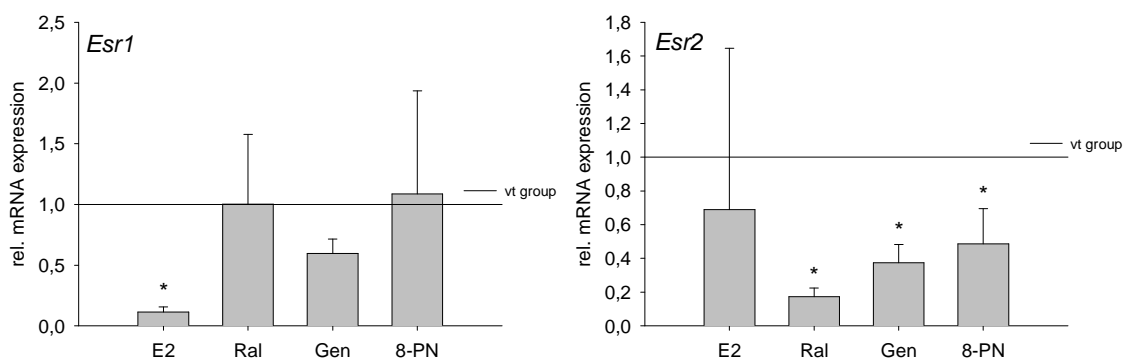


Abb. 4. 42 Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Esr1* und *Esr2* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E_2 , Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

Indikatorgene für östrogene Responsivität wie *Pgr*, *Ltf* und *Clu* wiesen nach der E_2 -Gabe unterschiedliche Effekte auf (Abb. 4.43). So wurde die *Pgr* mRNA verglichen mit

der Kontrollgruppe nach der E₂-Behandlung signifikant 10-fach niedriger exprimiert (Abb. 4.43). *Ltf* mRNA wurde nach der Verabreichung von E₂ signifikant 30-fach höher exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mRNA des *Clu* wies keine veränderte Expression nach der E₂-Gabe im Uterus auf (Abb. 4.43). Die Genexpressionsanalyse des *Pgr* zeigte nach der Behandlung mit Raloxifen und 8-PN eine 2-fach erhöhte Expression, während es aber nach der Behandlung mit Genistein zu keiner Regulationsveränderung kam im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren (Abb. 4.43).

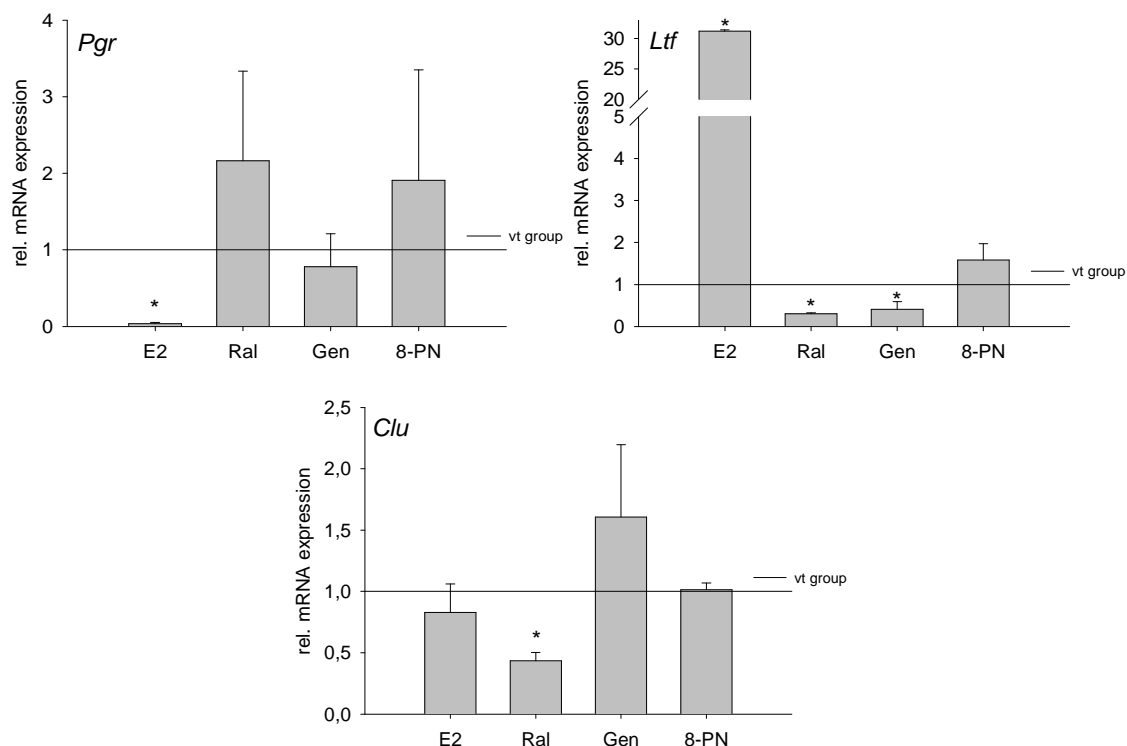


Abb. 4. 43 Expression der östrogenregulierten Gene im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pgr*, *Clu* und *Ltf* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Die mRNA des wichtigsten Markergen für Östrogen induzierte Antworten im Mausuterus *Ltf* wurde durch die Behandlung mit Raloxifen und Genistein signifikant um das 2-fache niedriger exprimiert, während eine Behandlung mit 8-PN keinen Einfluss auf die Expression hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe. *Clu* mRNA zeigte lediglich nach der Behandlung mit Raloxifen im Uterus eine Expressionsveränderung dahingehend, dass sie

signifikant um die Hälfte niedriger exprimiert wurde. Durch die beiden Substanzen Genistein und 8-PN fand keine Regulation der Expression statt.

Die Behandlung mit E_2 resultierte in den Genen, die möglicherweise eine molekulare Verbindung zwischen dem MetS und der Östrogendefizienz darstellen, in dem Maß, dass die mRNA des *Pparg* signifikant mehr als 10-fach niedriger, die mRNA des *Il6* hingegen signifikant um das 2,5-fache höher exprimiert wird als in den Kontrolltieren (Abb. 4.44).

Die Substanzbehandlung mit Raloxifen und 8-PN bewirkte im Uterus der ArKO-Mäuse eine Verringerung des mRNA-Spiegels von *Pparg* und *Il6*. Dabei wurde der *Pparg* um das 10-fache und *Il6* um die Hälfte niedriger exprimiert als im gleichen Gewebe der Kontrollgruppe (Abb. 4.44).

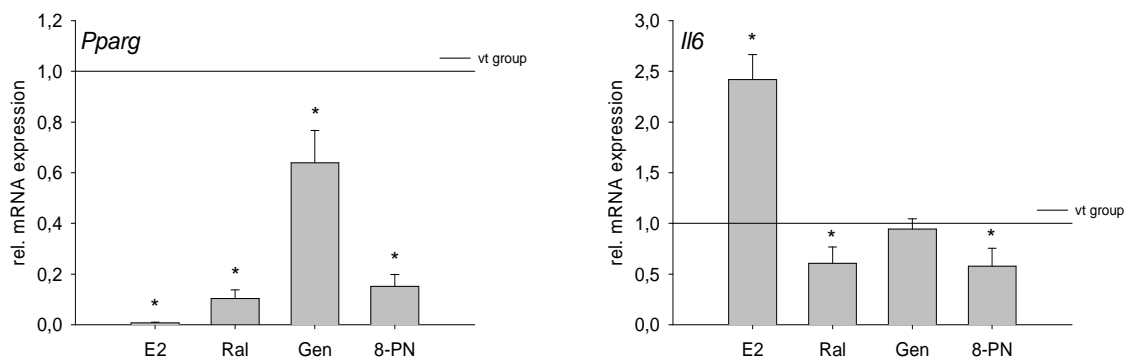


Abb. 4. 44 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im Uterus

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg* und *Il6* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E_2 , Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die *vehicle* behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

4.4.2.2 Gonadales Fettgewebe

Das Gewicht des gonadalen Fettgewebes wurde zwar nicht erfasst, aber während der Sektion konnte bereits festgestellt werden, dass es zum Teil unter dem Einfluss der Testsubstanzen stand. So war z. B. das Volumen an gonadalem Fettgewebe nach der Behandlung mit E_2 sichtbar weniger geworden.

Die Behandlung mit E_2 resultierte für die mRNA des *Esr1* in einer 1,8-fach verringerten Expression verglichen mit den Kontrolltieren. Hingegen die Behandlung mit Raloxifen und Genistein keine Veränderung für die Expression der mRNA des *Esr1* aufwies. Nach der Behandlung mit 8-PN konnte aber eine 2-fach erhöhte Expression der mRNA des *Esr1* im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden.

Die mRNA des östrogenresponsiven Gens *Clu* wurde nach der E_2 -Behandlung herunterreguliert. Die mRNA-Expression im gonadalen Fettgewebe für *Clu* war nach den Behandlungen mit Raloxifen (6-fach), Genistein (5-fach) und 8-PN (5-fach) höher als die im gleichen Gewebe der Kontrolltiere (Daten nicht gezeigt).

Eine E_2 -Behandlung bewirkte auf die Expression der Gene, die mit dem MetS eine molekulare Verbindung darstellen, eine Herunterregulation verglichen mit der kontrollbehandelten Gruppe. Diese Beobachtung ist für die Gene *Lep* (5-fach) und *sterol regulatory element-binding protein* (*Srebp*) (2-fach) signifikant (Abb. 4.45). Die Behandlung mit den drei östrogenen Testsubstanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN resultierte für die mRNA des *Lep* in keiner veränderten Expression verglichen mit der Kontrollgruppe. Die mRNA von *Lepr* und *Insr* zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach allen Behandlungen einen niedrigeren Expressionsspiegel. Dabei war die Beobachtung der verringerten Expressionsstärke für den *Lepr* nach der Behandlung mit den Substanzen Raloxifen (5-fach) bzw. 8-PN (2,5-fach) signifikant, ebenso zeigte der *Insr* nach der Genisteinbehandlung eine 3-fach verringerte Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.45).

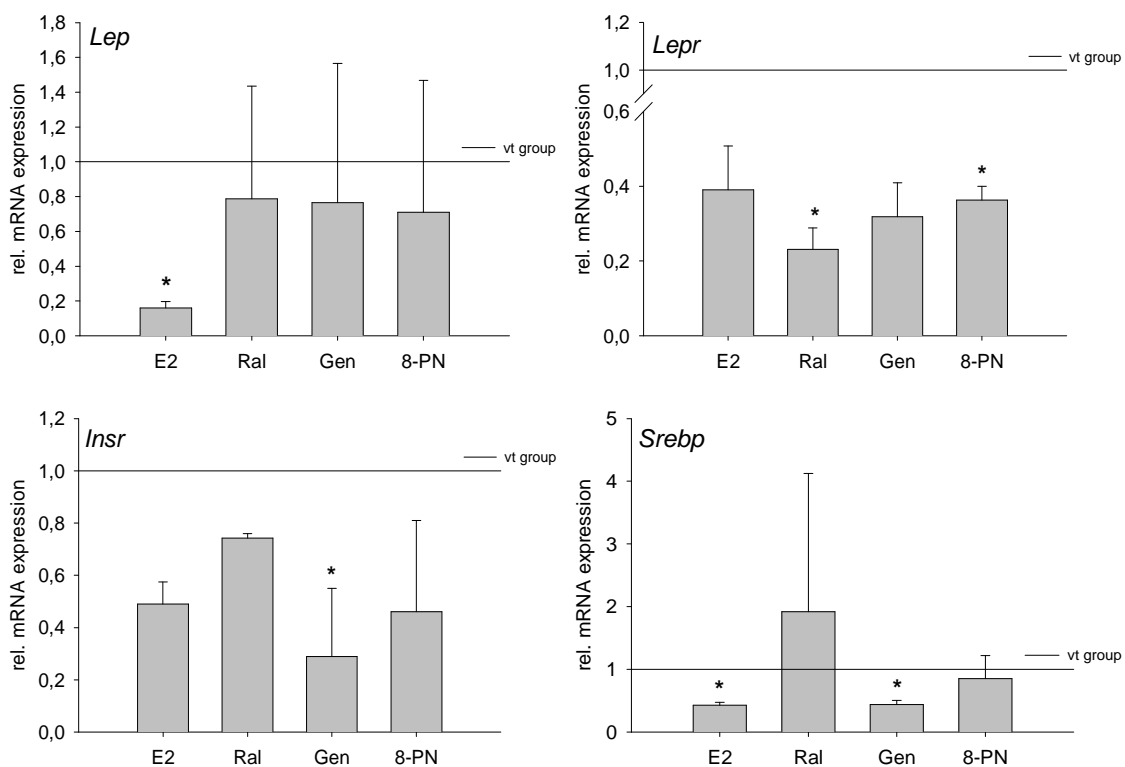


Abb. 4. 45 Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr*, *Insr* und *Srebp* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Nach der E₂-Behandlung zeigte sich, dass der *Pparg* keine Veränderung im Spiegel seines mRNA-Niveaus aufwies, während bei *Il6* (2-fach), *Il6ra* (2,5-fach) und *Tnfa* (2-fach) eine niedrigere mRNA-Expression beobachtet wurde als in den Kontrolltieren (Abb. 4.46). Dies ist für *Il6* im gonadalen Fettgewebe signifikant. Nach der Raloxifenbehandlung ergaben sich im gonadalen Fettgewebe eine 3-fach höhere Expression der mRNA für den *Pparg*, eine 3-fach niedrigere Expression für den *Tnfa* sowie eine 4-fach niedrigere Expression für die *Il6ra* mRNA verglichen zu der Kontrollgruppe (Abb. 4.46). Keine Veränderung wurde im Vergleich zur kontrollbehandelten Gruppe nach der Behandlung mit Raloxifen beim *Il6* festgestellt. Die Genisteinbehandlung induzierte eine Stimulation der Expression der mRNA des *Pparg* und eine 4-fache Repression des *Tnfa*, aber keine veränderte Regulation

der Expression der Gene *Il6* und *Il6ra* verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine erhöhte Expression der mRNA des *Pparg* (3-fach) und eine 2-fach höhere Expression der mRNA des *Il6* konnten nach der Behandlung mit 8-PN im gonadalen Fettgewebe gezeigt werden. Die Expression der mRNA von *Tnfa* und *Il6ra* zeigte keine veränderte Expression im gonadalen Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

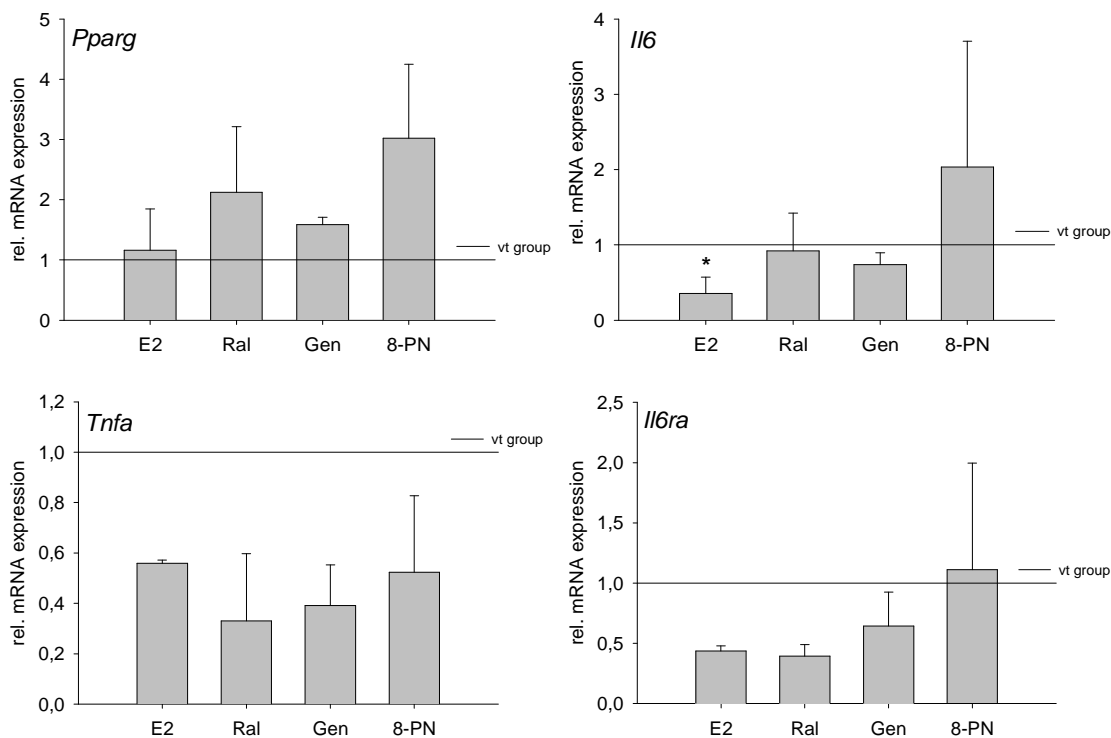


Abb. 4. 46 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im gonadalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg*, *Il6*, *Tnfa* und *Il6ra* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

4.4.2.3 Infrarenales Fettgewebe

Die mRNA-Expression nach der E₂-Gabe zeigte eine 1,2-fache erhöhte Expression des *Esr1* und eine 2-fach signifikant verringerte Expression der mRNA des *Clu* im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Kein verändertes Genexpressionsniveau wurde in den Genen *Lepr* und *Insr* nach der E₂-Behandlung festgestellt (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Expression östrogenregulierter Gene und Genen mit einer Verbindung zum MetS im infrarenalen Fettgewebe von *Esr1*, *Clu*, *Lepr* und *Insr* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen, Genistein und 8-PN im Vergleich zur kontrollbehandelten Gruppe. * p<0,05
↑ erhöhte Expression, ↓ niedrige Expression, = keine Veränderung der Expression.

	E ₂	Ral	Gen	8-PN
<i>Esr1</i>	↑	=	↑	=
<i>Clu</i>	↓*	=	↓	↓*
<i>Lepr</i>	=	↓	↓	↑
<i>Insr</i>	=	↑	=	↑

Die Behandlung mit Raloxifen zeigte keine veränderte Regulation für die Expression der Gene *Esr1* und *Clu* wohl aber eine 5-fach verringerte Expression der mRNA des *Lepr* und eine 2-fach erhöhte Expression des *Insr* verglichen mit den Kontrolltieren. Nach der Genisteinbehandlung wiesen der *Esr1* im Vergleich zu den Kontrolltieren eine 4-fach erhöhte Expression und der *Lepr* eine 2-fache Repression auf. Eine signifikante 2-fach verringerte mRNA-Expression konnte nach der Behandlung mit 8-PN für das Gen *Clu* gezeigt werden verglichen mit den kontrollbehandelten Tieren (Tab. 4.1). Eine erhöhte Expression nach der 8-PN-Behandlung zeigte sich im infrarenalen Fettgewebe für die mRNA von *Lepr* (2,5-fach) und *Insr* (2-fach) verglichen mit dem gleichen Gewebe der Kontrollgruppe (Tab. 4.1).

Srebp, *insulin-induced gene (Insig)1*, *Insig2* und *Glut4* sind ebenfalls Gene, die in Verbindung mit der Pathogenese des MetS stehen. Mit der E₂-Gabe konnte gezeigt werden, dass sich die mRNA-Expression von *Srebp* und *Glut4* im infrarenalen Fettgewebe nicht verändert hat, wohl aber eine 2-fach signifikant niedrigere mRNA-Expression bei *Insig1* und *Insig2* nachweisbar war im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Abb. 4.47). Nach der Behandlung mit Raloxifen konnte beobachtet werden, dass die mRNA von *Srebp* und *Insig2* eine

signifikant 2-fach niedrigere Expression aufwies und für die Expression der Gene *Insig1* und *Glut4* keine Veränderung verglichen mit der Kontrollgruppe detektierbar war (Abb. 4.47). Die Behandlung mit Genistein führte im infrarenalen Fettgewebe für die Gene *Srebp*, *Insig1* und *Insig2* zu keiner Veränderung der Expressionsspiegel. *Glut4* hingegen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Genisteinbehandlung eine 1,5-fache Stimulation der mRNA-Expression im infrarenalen Fettgewebe. Die 8-PN-Behandlung resultierte für die Gene *Srebp*, *Insig1* und *Glut4* in keiner Veränderung des Expressionsspiegels in Bezug auf die Kontrollgruppe, während die mRNA-Expression des *Insig2* im infrarenalen Fettgewebe nach der 8-PN-Behandlung um das 2-fach signifikant verringert wurde.

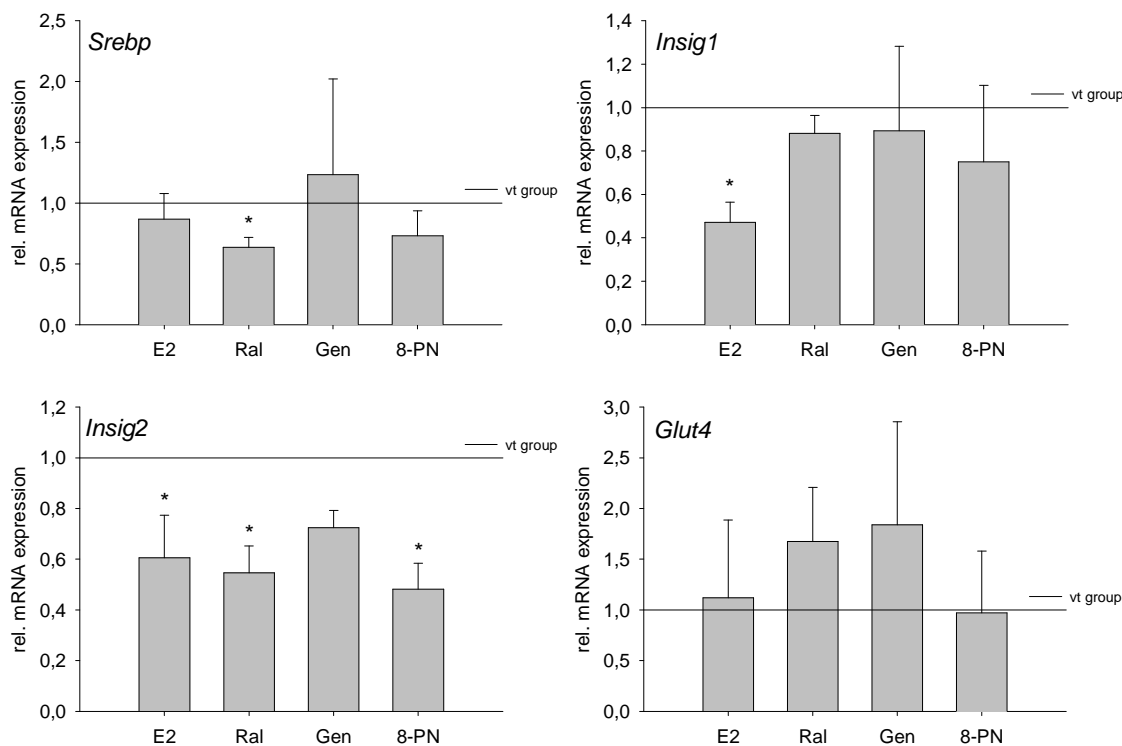


Abb. 4. 47 Expression der Gene, die mit dem MetS verbunden sind, im infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr*, *Insr* und *Srebp* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, * $p \leq 0,05$

In der Gruppe der Gene mit einer möglichen molekularen Verbindung zwischen dem MetS und der Östrogendefizienz kam es nach der E₂-Behandlung zu keiner Veränderung der Expression im infrarenalen Fettgewebe in den Genen *Pparg*, *Il6*, *Il6ra* und *Tnfa* bezogen auf die Kontrollgruppe (Abb. 4.48).

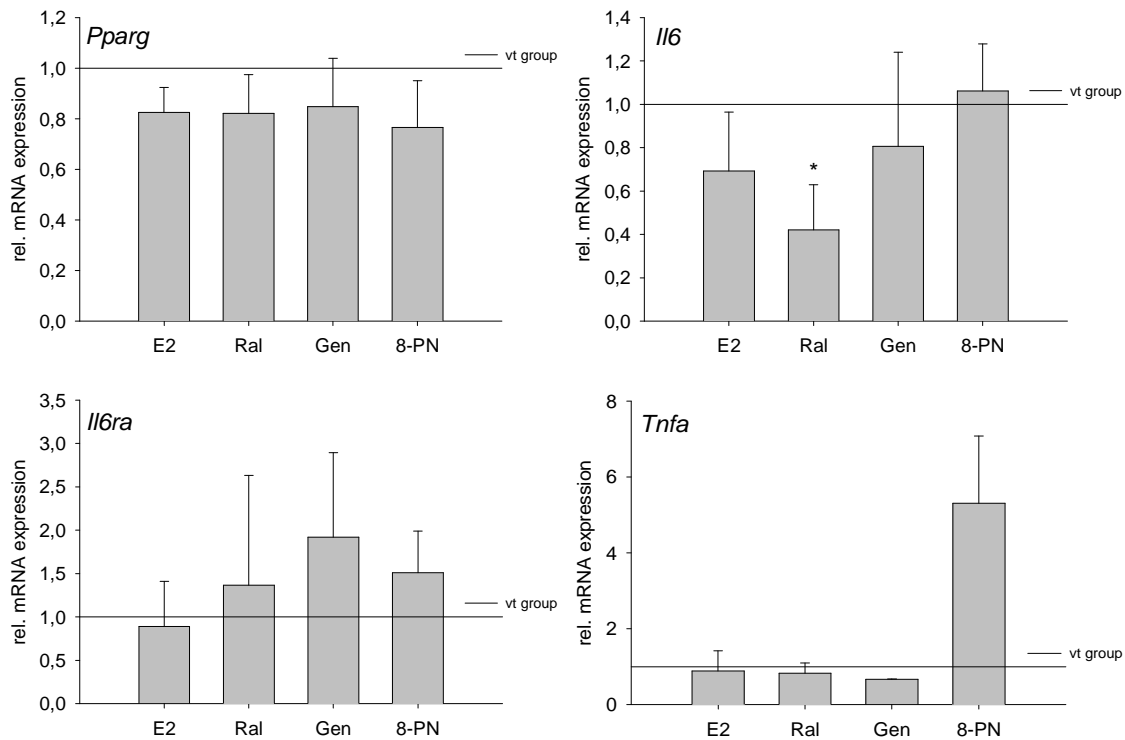


Abb. 4. 48 Expression der Gene mit einer Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz im infrarenalen Fettgewebe

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg*, *Il6*, *Tnfa* und *Il6ra* nach 21-tägiger Behandlung durch Siliconimplantate mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Die Expression aller Gene ist normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, *p ≤ 0,05

Beim *Pparg* blieb nach der Behandlung mit den östrogenen Testsubstanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN die Expression der mRNA unverändert in Bezug zu den Kontrolltieren (Abb. 4.48.). Die mRNA des *Il6* dagegen zeigte im infrarenalen Fettgewebe eine signifikant 2,5-fach niedrigere Expression nach der Raloxifenbehandlung im Vergleich zur kontrollbehandelten Gruppe. Die Gabe von Genistein und 8-PN hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Il6* im infrarenalen Fettgewebe. Der *Il6ra* dagegen zeigte verglichen zur Kontrollgruppe einen 2-fach höheren mRNA-Spiegel nach der Behandlung

mit Genistein. Allerdings konnte kein Einfluss durch die Substanzen Raloxifen und 8-PN auf den *Il6ra* beobachtet werden. Die mRNA des *Tnfa* wiederum zeigte keine veränderte Expression nach der Behandlung mit Raloxifen und Genistein verglichen mit der kontrollbehandelten Gruppe im infrarenalen Fettgewebe. Die Exposition mit 8-PN steigerte die Expression des *Tnfa* um das 5-fache verglichen mit der Kontrollgruppe im infrarenalen Fettgewebe.

5. Diskussion

Die Prävalenz der Adipositas ist in den letzten 20 Jahren dramatisch angestiegen. Dieser Trend ist nicht mehr nur in den westlichen Staaten, sondern auch im asiatischen Raum zu beobachten (214). Damit gehört Adipositas in der heutigen Zeit zu einem der bedeutendsten Faktoren für die Ausbildung des MetS. Obwohl Adipositas eine erbliche Komponente besitzt, welche allerdings unter 10 % liegt (215), ist damit aber nicht dieser enorme Anstieg zu erklären (216,217). Ein Erklärungsansatz ist die im Vergleich zu Früher stark veränderte Lebensweise der Menschen. So findet in der Ernährung ein Trend zu fett- und salzreicher Nahrung statt, bei gleichzeitig sinkender körperlicher Aktivität.

Bei 40 % aller postmenopausalen Frauen in den USA wurden Symptome des MetS festgestellt (218,219). Dabei zeigen postmenopausale Frauen Symptome wie erhöhtes Körpergewicht, Zunahme der Fettmasse (220), erhöhte Insulinspiegel (218,221) und erhöhte Leptin-Spiegel (218,221). Die eingetretene Östrogendefizienz löst bei einer Vielzahl der Frauen eine Gewichtszunahme aus, welche sich nicht nur durch den veränderten Stoffwechsel erklären lässt (93).

Zurzeit gibt es kontroverse Diskussionen darüber, ob durch eine Hormonersatztherapie (HRT) Symptome des MetS vermindert werden können. Durch eine HRT konnte einerseits gezeigt werden, dass die Insulinsensitivität verbessert, das Körperfett reduziert, Lipid- und Cholesterinspiegel gesenkt sowie das Risiko an *Diabetes mellitus* Typ 2 zu erkranken verringert werden (222). Allerdings zeigten andererseits Studien keine Verbesserung der Symptome durch eine HRT (222) oder wiesen sogar eine Abnahme der Insulinsensitivität nach (223).

Es scheint offensichtlich einen Zusammenhang zwischen Östrogendefizienz und Adipositas zu geben. Während in gesunden prämenopausalen Frauen E_2 in den Ovarien produziert wird, beschränkt sich die Östrogenproduktion in der postmenopausalen Frau auf die Produktion peripherer Organe u.a. des Fettgewebes, welches jedoch nur deutlich geringere Mengen an E_2 produzieren kann. Im Fettgewebe findet der durch Aromatase katalysierte Prozess der E_2 -Produktion statt und stellt die wichtigste Östradiol-Quelle für Frauen nach der Menopause dar. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen Fettgewebe und Aromataseaktivität besteht (99).

Das am weitesten verbreitete präklinische, experimentelle Modell für Östrogendefizienz ist das ovariectomierte Tier. Mit diesem Modell werden Prüfungen von Substanzen durchgeführt, die zur Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden eingesetzt werden sollen oder bereits verwendet werden. Durch die Ovariectomie verliert das weibliche Tier das Potenzial, die Hormone Östrogen und Progesteron zu produzieren. Im Gegensatz zu diesem künstlich erzeugten menopauseähnlichen Zustand oder auch „chirurgischen Östrogendefizienz“ geht bei der unter natürlichen Bedingungen eintretenden Menopause zwar die Hormonproduktion in den Ovarien dramatisch zurück, allerdings stellen sie die Produktion der C₁₉-Steroide nie gänzlich ein (224).

Fisher *et al.* und Toda *et al.* haben unabhängig voneinander ein Mausmodell entwickelt, welches, durch genetische Manipulation bedingt, nicht in der Lage ist, Östrogene zu bilden (103,104). Diese Östrogendefizienz wird durch das Ausschalten des Cyp19 (Aromatase)-Gens hervorgerufen, daher auch der Name ArKO-Maus.

Die im Folgenden diskutierten mRNA-Expressionsdaten basieren ausschließlich auf real-time PCR Analysen und können daher nur einen eingeschränkten Eindruck über Einflüsse und Effekte wiedergeben. Es muss weiterhin bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten statistischen Methoden zwischen einer rein mathematischen und einer biologischen Relevanz unterschieden werden. So kann es auf Grund einer geringen Standardabweichung der Genexpressionsdaten bei einer Behandlungsgruppe zu einer mathematischen Signifikanz kommen. Dies muss aber nicht bedeuten, dass hier auch eine biologische Relevanz vorliegt.

5.1 Vergleichende Evaluierung chirurgisch und genetisch bedingter Östrogendefizienz (TV 1 und TV 2)

Die ArKO-Maus wurde als ein Tiermodell unter anderem erzeugt, um einen Beitrag bei der Erforschung von Phänomenen der Östrogendefizienz zu leisten. Für Studien mit Fragestellungen zur Behandlung menopausaler Beschwerden ist gegenwärtig das kastrierte, ovariectomierte Tier das bevorzugte präklinische experimentelle Modell.

Mit der tierexperimentellen Studie TV 1 wurden zwei östrogendefiziente Mausmodelle ovx WT und ArKO hinsichtlich ihrer östrogenen Empfindlichkeit verglichen. Darauf aufbauend wurde in TV 2 ein Vergleich der Wirksamkeit einer Östrogenbehandlung in Abhängigkeit des Lebensalters der ArKO Mäuse untersucht. Es konnte generell gezeigt werden, dass die ArKO-Mäuse ein höheres Körpergewicht aufwiesen verglichen mit den WT-Wurfgeschwistern. Die ovx WT-Wurfgeschwister nahmen in der vergleichsweise kurzen Zeit von 14 Tagen des Hormonabfalls nach der Ovariectomie ebenfalls an Gewicht zu. Der Effekt der Gewichtszunahme nach einer Ovariectomie wurde in Publikationen bereits beschrieben (225). Verglichen mit dem Gewicht der ArKO-Mäuse kann hier aber nur von einer geringen Gewichtszunahme gesprochen werden. Weiterhin zeigte sich, dass adulte zwölf Monate ArKO-Mäuse ein signifikant höheres Körpergewicht aufweisen im Vergleich zu ihren adulten WT-Wurfgeschwistern (1,28-fach) sowie auch zu jungadulten (drei Monate alten) ArKO-Mäusen (1,4-fach) (Abb. 4.1 und 4.10). Eine Beobachtung, die bereits Jones *et al.* (115,116) machten und die mit dieser Arbeit verifiziert werden konnte. Ebenfalls kann der (Funktions-)Verlust des Östrogenrezeptors (ER)- α zu einer Gewichtserhöhung führen. So wird in der Literatur der Effekt beschrieben, dass Mäuse, in denen der ER α inaktiviert wurde (α ERKO-Mäuse), zu einem 14%ig höherem Körpergewicht neigen als die entsprechenden WT-Mäuse (226). Interessanterweise lässt sich diese Beobachtung nicht bei Tieren machen, in denen der ER β inaktiviert wurde (β ERKO). Eine erhöhte Futteraufnahme und ein daraus erhöhtes Körpergewicht kann für die ArKO-Mäuse wie auch für die α ERKO-Mäuse ausgeschlossen werden (116). Für die ArKO-Maus wurde sogar gezeigt, dass deren Futteraufnahme im Trend niedriger ist als die der entsprechenden WT-Mäuse (116). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Östrogendefizienz zu einem erhöhten Körpergewicht führt, egal ob sie chirurgisch durch ovx oder durch genetische Modifikation, wie bei der ArKO-Maus vorhanden, erzeugt wurde.

5.1.1 Uterus

Der Uterus gilt als eines der klassischen Zielorgane für endogene und exogene Östrogene (227). Welche Auswirkung eine Östrogendefizienz auf den Uterus hat, konnte mit einer

Vielzahl an Studien bereits beschrieben werden. Für ArKO-Mäuse ist bekannt, dass die Uteri lediglich 26 - 56 % des Uterusfeuchtgewichtes der entsprechenden WT-Wurfgeschwister wiegen (103,228). Durch eine Ovariectomie kommt ebenfalls die endogene Östradiolproduktion beinahe zum Erliegen, was in einem starken Rückgang des Uterusfeuchtgewichtes zum Ausdruck kommt (229). Ebenso resultiert der Funktionsverlust des ER α in einem verringerten Uterusfeuchtgewicht. Dabei zeigte sich, dass das Uterusgewicht bei α ERKO-Mäusen (230) und $\alpha\beta$ ERKO-Mäusen (230,231) nur ein Drittel von dem der WT-Mäusen entspricht. Mit der AF2ERKI-Maus wurde ein weiteres Mausmodell erzeugt, welches aufzeigt, dass der ER α eine wichtige Rolle in der E₂-Responsivität spielt. Diesem Modell fehlt der AF-2 der LBD des *Esr1* (232). Auch hier zeigte sich ein deutlich unterentwickelter Uterus. Die homozygoten weiblichen Tiere der AF2ERKI-Maus wurden als infertil beschrieben (232). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der AF-2 eine wichtige Rolle bei der E₂-Vermittlung im *Esr1* für die Entwicklung der reproduktiven Organe spielt (232). Eine Behandlung der AF2ERKI-Mäuse mit E₂ zeigte keine Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes (232,233), was auch schon bei den α ERKO Mäusen beobachtet wurde. Womit herausgestellt wird, dass der ER α der Rezeptor im Uterus zu sein scheint, der über die Responsivität zu E₂ maßgeblich entscheidet. Der Uterus der β ERKO-Maus dagegen zeigte in tierexperimentellen Studien durchaus eine E₂-Responsivität (230). Somit spielt nicht nur das endogene Östrogen bei der Entwicklung des Uterus eine Rolle, sondern auch ein funktionierender ER α ist dafür notwendig.

Mit dem TV 1 konnte gezeigt werden, dass die Uteri der ovx WT-Mäuse signifikant schwerer waren als die der ArKO-Mäuse (Abb. 4.2). Exogen zugeführtes E₂ resultiert bei ArKO-Mäusen zwar in einer Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes, erreicht aber nicht die Werte, welche in den vt WT-Wurfgeschwister gemessen wurden. Bei dem Vergleich unterschiedlich alter ArKO-Mäuse konnte gezeigt werden, je höher das Lebensalter unter Östrogenmangel, desto geringer wird das Uterusfeuchtgewicht. Diese Beobachtung stellte sich statistisch signifikant dar (Abb. 4.11). Durch eine Substitution mit E₂ nimmt zwar das Uterusfeuchtgewicht zu, allerdings bleibt das unterschiedliche Lebensalter weiterhin nachweisbar. Dies scheint ein Ergebnis der längeren Östrogendefizienz zu sein, welcher die zwölf Monate alten ArKO-Mäuse ausgesetzt waren. Auch nach einer

Behandlung mit Soja-Isoflavonoid Genistein zeigen die drei Monate alten ArKO-Mäuse ein höheres Uterusfeuchtgewicht verglichen zu den älteren ArKO-Mäusen.

Basierend auf den physiologischen Befunden lässt sich vermuten: Die östrogene Empfindlichkeit des Uterus ist, bedingt durch die lebenslange permanente Östrogendefizienz, in den ArKO-Mäusen eingeschränkt.

Um die Ungleich-Vermutung der experimentellen Modelle, die sich aus den physiologischen Daten im Uterus ergaben, auf Geneexpressionsebene zu validieren, wurden uterusrelevante östrogenregulierte Markergene untersucht. Theoretisch wäre zu erwarten, wenn beide östrogendefiziente Mausmodelle (ovx WT und vt ArKO) vergleichbar wären und in der derselben Art und Weise auf Östrogen ansprechen, sollte dies in einem vergleichbaren Regulationsmuster für die östrogenresponsiven Gene resultieren. Die meisten untersuchten Gene im Uterus zeigten aber keine identische Regulation der mRNA-Expression beim Vergleich der beiden Modelle.

Mit der zweiten durchgeführten tierexperimentellen Studie (TV 2) konnte ein mit dem Alter in Verbindung stehendes Regulationsmuster nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, bis auf einige Ausnahmen, dass die untersuchten Gene bei den unbehandelten drei Monate alten ArKO-Mäusen höher exprimiert wurden als in den zwölf Monate alten Tieren. Eine E_2 - bzw. Genisteinbehandlung kehrt diese Beobachtung allerdings um, danach zeigte sich, dass die untersuchten Gene in den älteren Tieren höher exprimiert werden. Dies kann als Beweis gedeutet werden, dass es eine altersabhängige Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber östrogenen Substanzen gibt.

Für die Genregulation in beiden Tierversuchen konnten zwei Ausprägungen aufgedeckt werden, welche in allen untersuchten Gen-Gruppen (Tab. 1.4 - 1.6) auftraten. Eine Charakteristik der untersuchten Gene war, dass die mRNA-Expression eines Gens für beide Modelle in dieselbe Richtung reguliert wurde, lediglich die Größenordnung der Expressionsänderung unterscheidet sich. Beispielhaft sei hier die Regulation des Gens *Ltf* genannt (Abb. 4.5). Die zweite Charakteristik der untersuchten Gene war gekennzeichnet durch eine inverse Regulation der mRNA zwischen den beiden Mausmodellen. Ein

Beispiel dafür ist die sich unter Östrogeneinfluss zeigende entgegengesetzte mRNA-Expression des *Esr2* im Uterus beider Modelle (Abb. 4.4).

Für den *Esr2* konnte bei den WT-Mäusen unter Östrogeneinfluss eine verringerte Expression der mRNA nachgewiesen werden, während unter dem gleichen Einfluss bei den ArKO-Mäusen eine Stimulation der mRNA stattfand (Abb. 4.4). Beobachtungen in ovx Ratten zeigten, dass der *Esr2* nach einer Behandlung mit E_2 im Uterus eine verringerte mRNA-Expression aufweist (234). Hier wurden ovariectomisierte *Sprague-Dawley* Ratten mit E_2 behandelt und zeigten anschließend eine Verringerung der mRNA-Expression des *Esr2* (234). Diese Beobachtung konnte auch für den *Esr2* im Uterus in den untersuchten intakten WT-Mäusen gemacht werden (Abb. 4.4). Eine E_2 -Behandlung der ArKO-Mäuse allerdings resultiert in einer erhöhten mRNA-Expression des *Esr2* im Uterus (Abb. 4.4).

Mit dem Vergleichen von ArKO- mit WT-Mäusen konnte die von Toda et al. publizierte erhöhte mRNA-Expression des *Pgr* nicht reproduziert werden (104). Im Gegensatz zu Toda et al. wurde in dieser Arbeit eine verringerte Expression für den *Pgr* in Anwesenheit von E_2 festgestellt (104). Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Toda et al. ergibt sich möglicherweise daraus, dass die verwendeten Tiere zum einen älter waren und die für die Behandlung verwendeten E_2 -Dosen deutlich höher lagen (104). Auch war die Behandlungsdauer bei Toda et al. länger (104). Für die ovx Ratte finden sich Veröffentlichungen, bei der die mRNA-Expression des *Pgr* zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer E_2 -Behandlung gemessen wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass sieben Stunden nach Behandlung die mRNA-Expression des *Pgr* erhöht war, aber nach 72 Stunden sogar unter das Expressionsniveau der ovx Ratten sank (143,235,236).

Das Gen *Ltf* ist bekannt dafür, dass es eines der empfindlichsten Markergene gegenüber E_2 -abhängigen Regulationen im Uterus ist (165). Es wurde gezeigt, dass vier Stunden nach einer E_2 -Injektion die Expression des *Ltf* im Uterus um das 300-fache gestiegen ist (165).

Nach dem Vergleichen von ArKO- mit WT-Mäusen konnten Toda et al. ebenfalls eine erhöhte mRNA-Expression für das Gen *Ltf* feststellen (104). Hier zeigten beide Mausmodelle unter Östrogeneinfluss eine erhöhte Expression, allerdings wird *Ltf* im Uterus der WT-Mäuse um 3,5-fache höher exprimiert (Abb. 4.5). Die im TV 2 gezeigten Ergebnisse legen weiterhin nahe, dass *Ltf* substanzspezifisch reguliert wird. Grund dafür

ist eine erhöhte Expression nach der E_2 -Behandlung und eine verringerte mRNA-Expression nach der Genisteinbehandlung. Bekannt ist, dass Genistein eine höhere Affinität zum ER β hat, im Uterus aber der ER α vorrangig zu finden ist. Weiterhin könnte auch die Rekrutierung von Koaktivatoren Einfluss darauf haben, die bekannt dafür sind, die Transkriptionsrate steigern zu können (72,237). Es ist bekannt, dass der ER α mit einer Vielzahl an Proteinen interagiert, die als Koaktivatoren fungieren können (238). Solche Koaktivatoren können zum Beispiel die CREBP-Binde-Proteine sein (238). Diese Frage kann allerdings nicht allein mit den Daten aus dieser Arbeit beantwortet werden und bedarf einer weiterführenden Untersuchung mit anderen Methoden.

Im Gegensatz zu tierexperimentellen Studien mit Rattenuteri, bei denen eine verringerte Expression des *Esr1* nach einer E_2 -Behandlung gezeigt wurde (239), konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Expression des *Esr1* nach der Behandlung mit E_2 in drei Monate alten ArKO-Mäusen nachgewiesen werden. Dies steht im völligen Widerspruch zu den Ergebnissen von TV 1. Beschrieben wird im Allgemeinen eine verringerte mRNA-Expression des *Esr1* nach E_2 -Behandlung wie es in TV 1 bei den ArKO- und WT-Mäusen beobachtet wurde. Es kann nur vermutet werden, dass es sich hierbei um eine Auswirkung der lebenslangen Östrogendefizienz in den Uteri der ArKO-Mäuse handelt. Diese Aussage wird mit der mRNA-Regulation des *Clu* weiter unterstützt, auch hier stehen die gemachten Beobachtungen im Widerspruch zu den Daten wie sie in der Literatur zu finden sind. Wird doch ein klares Expressionsmuster dahingehend beschrieben, dass die Expression von *Clu* durch eine Behandlung mit E_2 im Uterus inhibiert wird (227).

Gene, die im Verdacht stehen, eine molekulare Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz darzustellen, wie *Pparg* (92), *Il6* (95) und *Tnfa* (100), zeigten bei dem Vergleich der mRNA-Basisexpression in den Uteri der beiden Mausmodelle (WT und ArKO) als auch bei den verschiedenen Altersgruppen Unterschiede in der Größe der Expression (Abb4.6 und 4.16). Die Expression des *Pparg* war nach der E_2 -Behandlung in den drei Monate alten ArKO-Mäusen und den intakten WT-Tieren niedriger exprimiert verglichen mit den jeweiligen östrogendefizienten Pendants.

Einhergehend mit diesen Daten konnte in Versuchen an ovariectomierten Ratten gezeigt werden, dass der *Pparg* eine verringerte mRNA-Expression nach der Ovariectomie aufwies, was sich nach einer Behandlung mit E_2 auch nicht änderte (240). Anders verhielt sich allerdings die Expression in den zwölf Monate alten ArKO-Mäusen, hier zeigte der *Pparg* eine erhöhte Expression nach der Behandlung mit E_2 und Genistein.

Die mRNA von *Il6* bzw. *Tnfa* wurde in den Uteri der unter Östrogeneinfluss stehenden Mäuse für beide Mausmodelle nicht nur in dieselbe Richtung exprimiert, sondern auch auf eine vergleichbare Expressionshöhe vermittelt (Abb. 4.6).

So lässt sich vermuten, dass sich für die Gene, die eine Assoziation zum MetS aufweisen, die Modellunterschiede der mRNA-Grundspiegel durch die Gabe von E_2 revidieren lassen. Dies konnte nicht im Fall der beiden unterschiedlichen Altersgruppen erreicht werden. Eine E_2 -Behandlung resultierte zum Teil in inversen mRNA-Expressionen (*Tnfa*). Es liegt die Vermutung nahe, dass auch hier die längere Östrogendefizienz oder aber das Alter einen starken Einfluss auf die Regulation der mRNA-Expression haben.

5.1.2 Fettgewebe

Das Fettgewebe ist das größte Energiedepot und spielt so eine große Rolle in der Energiehomöostase (109,241). Darüber hinaus wird es mittlerweile auch als das größte endokrine Organ wahrgenommen (31). So wurde nachgewiesen, dass es Sexualhormone speichern wie auch synthetisieren kann, wenn beides auch nur in geringen Mengen (98,242).

Im Normalfall geht man davon aus, dass das Körpergewicht mit dem Gewicht des Fettgewebes positiv korreliert. Was heißen soll, bei einem hohen Körpergewicht erwartet man auch eine erhöhte absolute Fettmasse. Wie bereits schon beschrieben nehmen die WT-Mäuse nach der Entfernung der Ovarien an Körpergewicht zu, was zu einer Verfettung des Körpers führt. Ebenso haben die östrogendefizienten ArKO-Mäuse einen signifikant höheren Körperfettanteil im Vergleich zu den ovx WT-Mäusen. Diese Beobachtung konnten Jones *et al.* bei ArKO-Mäusen auch machen. Bekannt ist, dass Leptin das Körperfett zum Beispiel durch eine Erhöhung der Futteraufnahme reguliert. Da ArKO-Mäuse über einen erhöhten Körperfettanteil verfügen, ist es nicht verwunderlich,

dass auch der zirkulierende Leptin-Spiegel erhöht ist. Aus der Tatsache heraus, dass ArKO-Mäuse, trotz erhöhtem Körperfettanteil, eine verminderte Nahrungsaufnahme aufweisen, schließen Jones *et al.*, dass die Mäuse normal auf Leptin ansprechen (115,116). Eine Zunahme des Fettgewebes konnte bei den ebenfalls östrogendefizienten α ERKO-Mäusen beobachtet werden. Bei der Östrogendefizienz in den α ERKO-Mäusen handelt es sich allerdings um einen „funktionellen“ Östrogenmangel, da die E_2 -Effekte zellulär nicht umgesetzt werden können. Somit scheinen im Fettgewebe die E_2 -Effekte hauptsächlich über den ER α vermittelt zu werden (226). Interessanterweise kommen Heine *et al.* zu dem Schluss, dass die Zunahme des Fettgewebes in der α ERKO-Maus nicht ein Resultat einer erhöhten Energieaufnahme ist, sondern Resultat eines reduzierten Energieaufwandes (226).

Beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Altersgruppen wurde aber festgestellt, dass das Gewicht des Fettgewebes nicht zwangsläufig in Korrelation zum Körpergewicht steht. So waren die zwölf Monate alten Tiere aller Behandlungsgruppen signifikant schwerer als die drei Monate alten Tiere, das Gewicht des Fettgewebes allerdings zeigte sich im Trend leichter. Eine Ausnahme bildet hier lediglich die Behandlungsgruppe mit Genistein. In diesem Fall korrelieren tatsächlich Körpergewicht und das Gewicht des Fettgewebes. Eine Erklärung, weshalb das Körpergewicht der ArKO-Mäuse auch nach einer E_2 -Behandlung nicht mit dem Gewicht des Körperfettes korreliert, lieferten Jones *et al.* mit der schon oben erwähnten Feststellung, dass ArKO-Mäuse offensichtlich normal auf Leptin ansprechen und daher keiner vermehrten Nahrungsaufnahme bedürfen (115,116).

Der Verlust von Östrogenen in der Menopause wird mit einem erhöhten Risiko für Adipositas assoziiert (243). Östrogene haben eine direkte Auswirkung auf das Fettgewebe, so verringert eine Ovariectomie die Lipolyse. Während eine E_2 -Gabe die Fettverbrennung verbessert und so zu einem Gewichtsverlust des Fettgewebes führt (115,243). Somit hat E_2 einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel sowohl über die genomischen als auch über die nicht genomischen Mechanismen der Östrogenrezeptoren (243). Toda *et al.* konnten zum Teil eine veränderte Regulation der Expression im

Fettgewebe der ArKO-Mäuse beobachten und ziehen den Schluss daraus, dass es sich dabei um Folgen der Störung auf molekularer Ebene des Aromatase Gen *Cyp19* handeln muss (104).

Als ein anerkannter Indikator für Insulinresistenz gilt das Gen *Tnfa* während *Pparg* bekannt dafür ist Modulator der Leptinproduktion zu sein sowie ein Insulin-Sensitizer. *Tnfa* wird im adipösen Organismus vermehrt in den Fettzellen synthetisiert und es kann eine erhöhte Expression nachgewiesen werden (244,245). Der *Pparg* ist ein wichtiger Vermittler der Adipozytendifferenzierung und der Fettsäureaufnahme sowie Speicherung (246). Ein erhöhtes Körpergewicht führt daher zu einer erhöhten Expression der mRNA des *Pparg* (247). Die Expression dieser Gene wurde ausgewertet, da hier die Möglichkeit besteht, über ihre Expressionsspiegel möglicherweise eine mechanistische Verbindung zwischen Östrogenmangel und Symptomen des MetS herzustellen.

Durch Vergleich der beiden Mausmodelle konnte festgestellt werden, dass die mRNA des *Tnfa* im gonadalen Fettgewebe von WT-Mäusen eine höhere Expression aufweist im Vergleich zur Expression im entsprechenden Gewebe der ovx WT-Mäusen. Anders verhielt sich die mRNA-Expression des *Tnfa* im Fettgewebe der E₂-behandelten ArKO-Mäuse, hier lag eine Repression im Vergleich zu den kontrollbehandelten ArKO-Mäusen vor. Eine dauerhafte Östrogendefizienz wirkt sich offensichtlich auch auf die Ansprechbarkeit der Organe gegenüber E₂ aus (116).

Das Gen *Il6* codiert ein Zytokin, welches ein wichtiger Mediator von Entzündungsreaktionen ist und sich an der Reifung von β -Zellen beteiligt (248). Die Expression des *Il6* in den Adipozyten kann durch Insulin und TNF α stimuliert und durch Glykokortikoide inhibiert werden (249). Die beim Vergleich der experimentellen Modelle erhobenen Daten zu *Il6* im Fettgewebe decken sich mit denen, die in der Literatur beschrieben werden. In den Publikationen wird neben einer erhöhte Expression des *Il6* im adipösen Organismus auch ein erhöhter IL-6 Plasma-Spiegel aufgezeigt (250,251). Ebenso konnte in der Literatur gezeigt werden, dass eine Behandlung mit E₂ eine Verringerung des IL-6 Plasma-Spiegel bewirkt (252).

Mit TV 2 konnten altersbedingte Unterschiede auf der Ebene basaler Genexpression demonstriert werden. So konnte gezeigt werden, dass im Fettgewebe die

Expressionsspiegel in den Genen *Pparg*, *Lep*, *Lepr* und *Il6* bei den jüngeren Mäusen stärker ausgeprägt sind als in den der älteren Tiere. Bei der mRNA-Expression blieb auch nach der Behandlung mit E_2 bzw. Genistein der Altersunterschied sichtbar. So zeigten die Gene *Pparg*, *Lep* und *Lepr* nach der Behandlung das die höhere Östrogenresponsivität der jüngeren Tiere bestehen blieb.

Im Fettgewebe wird primär der *Esr1* exprimiert (253,254). Für *Esr1* ist die altersbedingte Veränderung in der Regulation seiner Expression substanzspezifisch. So wurde in den drei Monate alten ArKO-Mäusen eine geringere Expression nach einer E_2 -Behandlung nachgewiesen als im Vergleich zu den zwölf Monate alten Tieren. Dem gegenüber konnte nach der Behandlung mit Genistein eine höhere Expression von *Esr1* in jüngeren Tieren gezeigt werden verglichen mit den zwölf Monate alten ArKO-Mäusen. Dies lässt den Schluss für TV 2 zu:

Die Behandlungssubstanz wie auch das Lebensalter zum Zeitpunkt der Behandlung haben einen kombinierten Einfluss auf die Expression der östrogenresponsiven Gene im gonadalen und infrarenalen Fettgewebe. Die im infrarenalen Fettgewebe gemachten genregulatorischen Effekte waren in den mit Genistein behandelten Tieren noch ausgeprägter als im gonadalen Fettgewebe. Diese Beobachtung ist insofern interessant, da der *Pparg* als molekulares Ziel für Genistein beschrieben wird. Somit kann Einfluss auf den Prozess des Fettgewebeumbaus genommen werden (255). Im mikromolaren Bereich bindet Genistein dabei an den transaktivierte PPAR γ , was zu einer Erhöhung der Adipogenese führt (255). Allerdings konnten dosisabhängige Genisteineffekte im Fettgewebe beobachtet werden, so zum einen eine down-Regulation der Adipogenese und zum anderen die Balance zwischen der Aktivierung Östrogenrezeptoren und PPAR γ (255).

Um die eruierten Unterschiede im Fettgewebe beider Mausmodelle weiter zu untersuchen, wurde unter anderem auch der Serumleptin-Spiegel bestimmt. Es ist bekannt, dass der Serumleptin-Spiegel im adipösen Organismus erhöht ist (256). Mit einer Gewichtsreduktion kann aber dieser Spiegel reduziert werden (256). Die Serumleptin-Konzentration war in Studien bis zu viermal höher bei adipösen Menschen

im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen. Im TV 1 war der Leptinspiegel im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern bei den fettleibigen ArKO-Mäusen erhöht. Ähnliche Resultate konnten auch aus anderen Studien berichtet werden, in denen argumentiert wird, dass durch den erhöhten Fettkörperanteil der ArKO-Mäuse die Möglichkeit besteht, mehr Leptin zu produzieren (115,116). Jones *et al.* konnten zeigen, dass der zirkulierende Serumleptin-Spiegel in ArKO-Mäusen signifikant erhöht ist (115). Es gibt ebenfalls für den Menschen Veröffentlichungen, die eine Assoziation zwischen adipöser Figur und erhöhter Leptinproduktion herstellen (257). Widersprüchliche Ergebnisse zeigten sich für den Serumleptin-Spiegel in postmenopausalen Frauen. Einerseits wird beschrieben, dass der Serumleptin-Spiegel in der Menopause sinkt, was mit einer Abnahme des Östrogenspiegels diskutiert wird (258). Andererseits wurde bei postmenopausalen Frauen oft auch ein erhöhter Leptin-Spiegel nachgewiesen (218).

5.1.3 Einfluss des Lebensalters auf die Organphysiologie

Mit der tierexperimentellen Studie TV 2 konnte gezeigt werden, dass das Lebensalter beim Beginn der Behandlung eine wichtige Größe ist.

In Publikationen wurde gezeigt, dass eine DNA-Methylierung zwischen Zellgenerationen auftritt (259–261), was Veränderungen im Regulationsmuster der Genexpression zur Folge hat. Bei der DNA-Methylierung kommt es zu Geninaktivierung, dabei werden im Allgemeinen aber nur die Promotoren methyliert, die bereits inaktiv sind. Damit können Gene vollends stillgelegt werden. Während der Entwicklung des Organismus wird ein signifikanter Anteil sogenannter Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln methyliert.

Für einige der hier untersuchten Gene konnten CpG-Inseln ausgemacht werden, zum Beispiel für die Gene *Esr1*, *Ltf*, *Pgr* und *Lep*. Für das Gen *Pparg* allerdings wurden solche Inseln nicht gefunden.

5.1.4 Resümee der tierexperimentellen Studien TV 1 und TV 2

In TV 1 wurde eine vergleichende Bewertung zweier östrogendefizienter Mausmodelle durchgeführt. Geht man von der Hypothese aus, dass ArKO-Mäuse und ovx WT-Mäuse Pendant sind, so sollten zum einen die basalen Expressionsspiegel in beiden

Mausmodellen gleich sein. Veränderungen der physiologischen und molekularen Parameter sollten gegenüber der Ansprechbarkeit von E_2 ebenfalls ähnlich sein. Es ist allerdings offensichtlich dass, die molekularen Endpunkte wie an Hand der untersuchten Gene gezeigt in beiden Modellen nicht immer identisch reguliert werden. Daher lässt sich basierend auf den physiologisch und molekularbiologisch erhobenen Daten schlussfolgern, dass die unter Östrogenmangel stehenden ArKO-Mäuse auf eine Östrogenbehandlung ein anderes Muster der Antwort nachweisen als die ovx WT-Wurfgeschwister. In dem Zusammenhang sei auf das Uterusfeuchtgewicht verwiesen (Abb. 4.2), welches unter E_2 -Wirkung bei den vt WT-Mäusen um das 3,5-fache schwerer ist als bei den ArKO E_2 -Mäusen. Einen weiteren Punkt der Ungleichheit repräsentieren die östrogenresponsiven Gene im Uterus, die sich im basalen Spiegel der Expression unterscheiden (*Esr1*, *Esr2*, *Pgr*, *Ltf*) und nach der E_2 -Behandlung entweder ein inverses Regulationsmuster aufweisen (*Esr2*) oder auch eine unterschiedliche Ausprägung des Ausmaßes der Regulation der mRNA-Expression (*Pgr*, *Ltf*). Auch im Regulationsprofil der Expression des Fettgewebes lassen sich schon bei den Kontrollgruppen Unterschiede erkennen (*Tnfa*, *Il6*, *LepR*, *Insr*). Wie schon im Uterus lässt sich auch im Fettgewebe nach der Behandlung mit E_2 bei manchen Genen eine inverse Regulation feststellen (*Tnfa*) bzw. die Ausprägung der Expressionsänderung ist deutlich unterschiedlich (*LepR*, *Pparg*).

Daher erscheint die ArKO-Maus wenig geeignet für jene Untersuchungen, die allein die Östrogenprüfung im Zusammenhang mit der Behandlung von Symptomen der Menopause betreffen. Andererseits scheint es aber, dass die ArKO-Maus ein geeignetes Modell bei Fragen zu Zusammenhängen von Östrogenmangel und der Entstehung von Symptomen des MetS ist.

Für den Altersvergleich konnte eine gewebe- und genabhängige Veränderung der Ansprechbarkeit auf eine E_2 -Behandlung demonstriert werden. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmendem Alter die Reaktionsfähigkeit gegenüber E_2 in den untersuchten Zielgeweben gedämpft wird, wenngleich eine Ausnahme für das Gen *Ltf* im Uterus festgestellt wurde. Die Ergebnisse legen nahe, dass bei den ArKO-Mäusen das Alter der Tiere eine entscheidende Determinante der Östrogensensitivität ist und bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte. Dies scheint insofern wichtig, wenn die

Endpunktbetrachtung auf Gewebe und Gene abzielt, die besonders dem Alterungsprozess unterliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, welche Effekte durch E₂ auf die Proteinexpression zwischen den untersuchten Mausmodellen auftreten. Daher sollte in künftigen Charakterisierungsstudien der ArKO-Maus die Bestimmung der Proteinexpression eine wesentliche Rolle spielen, werden doch nahezu alle Funktionen des Organismus von Proteinen ausgeführt. Es sollte weiterhin von Interesse sein ausgewählte Hormonspiegel zu messen, um diese unter den Modellen zu vergleichen. Die ArKO-Maus wird bedingt durch den Ausfall der Aromataseaktivität als östrogendefizient beschrieben. Fisher *et al.* zeigten allerdings neben einem deutlich erhöhten Testosteronspiegel, für einige ArKO-Mäuse auch messbare E₂-Spiegel, die denen der WT-Mäuse vergleichbar waren (103).

5.2 Evaluierung der Beobachtungen in den Kurz- und Langzeitbehandlungen mit östrogenähnlichen Substanzen (TV 3 und TV 4)

Die Östrogenrezeptoren sind die einzigen Steroid-Rezeptoren, welche neben steroidal Verbindungen auch mit einer Vielzahl von nicht-steroidal Verbindungen interagieren können einschließlich SERMs, Phytoöstrogene und Xenoöstrogene (262,263). Daher lag es nahe zu prüfen, welchen Einfluss östrogenähnliche Substanzen auf ausgewählte Gene und Gewebe in der ArKO-Maus haben.

Der Leitgedanke, warum die ArKO-Maus als Tiermodell weiterverwendet wurde, war die Untersuchung der Zusammenhänge einer E₂-Defizienz und einer Substitution mit östrogenhaltigen Substanzen.

Mit den tierexperimentellen Studien TV 3 und TV 4 sollte zum einen geprüft werden, welchen Einfluss Raloxifen und pflanzlichen Sekundärmetaboliten im Vergleich zu E₂ nach einem drei-Tage uterotrophen Assay haben und zum anderen welchen Einfluss die Dauer der 21-tägigen Behandlung auf die Expression der untersuchten Gene im Uterus und Fettgewebe hat.

Das im TV 3 und TV 4 verwendete Raloxifen ist ein gut beschriebenes SERM (264). Mit dem Soja-Isoflavonoid Genistein wurde eine Substanz gewählt, für die bereits

östrogenähnliche Effekte auf den Knochen bei *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen werden konnten (265–268). 8-PN, ein Östrogenrezeptor-Agonist, ist ein bekanntes Phytoöstrogen (144). Alle Testsubstanzen finden Anwendung in der klassischen als auch in der alternativen Behandlung menopausaler Beschwerden (269).

Veränderungen des Körpergewichtes ließen sich in beiden tierexperimentellen Studien TV 3 und TV 4 nur bedingt nachweisen (Abb. 4.23 und 4.38). Die ArKO-Mäuse wiesen nach der Raloxifen-Kurzzeitbehandlung ein signifikant geringeres Körpergewicht auf (Abb. 4.23). Veränderungen, die sich anhand des Körpergewichtes nachweisen lassen, würde man nach einer längerfristigen Behandlung erwarten, da dafür länger andauernde Prozesse involviert sind. Dieser Effekt ist durchaus überraschend, da die Beobachtung nach der 21-tägigen Behandlung nicht verifiziert werden konnte. Black *et al.* zeigten, dass sich nach einer fünfwöchigen Behandlungszeit mit Raloxifen das Körpergewicht bei einer Konzentration von 0,01 mg/kg am stärksten verändert (270). Allerdings konnte durch eine steigende Raloxifenkonzentration von 0,1 mg - 10 mg/kg nur eine geringe Veränderung des Körpergewichtes verglichen zu den intakten Tieren nachgewiesen werden (270). Vergleichend zu den ovariectomierten Tieren konnten signifikante Unterschiede beim Körpergewicht nach der Raloxifenbehandlung gezeigt werden (270).

In leptindefizienten (ob/ob) und leptinresistenten (db/db)-Mäusen konnte nach einer Behandlung mit E₂ ein Sinken der Nahrungsaufnahme und eine Erhöhung des Energieaufwandes beobachtet werden (70). Dies führte zu einer Reduktion des Körpergewichtes. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch eine E₂-Behandlung eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes der ArKO-Mäuse beobachtet werden (Abb. 4.38), was den Daten von Jones *et al.* entspricht (115).

5.2.1 Uterus

Der Uterus gilt als eines der klassischen Zielorgane für endogenes und exogenes E₂ (227). Eine Behandlung mit E₂ stimuliert die uterine-epitheliale Proliferation (233,271), was in einer Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes resultiert. Dieser Effekt wird daher als Indikator für die Östrogenität einer Testsubstanz verwendet (272).

Eine Östrogenität von E₂ im Uterus von ArKO-Mäusen konnte sowohl nach der dreitägigen wie auch nach der 21-tägigen Behandlung beobachtet werden. Nach beiden Behandlungszeiträumen nahm das Uterusfeuchtgewicht signifikant zu, was den Literaturdaten entspricht. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass das Uterusfeuchtgewicht nach der 21-tägigen Behandlung um das 3,75-fache schwerer war als das nach der dreitägigen Gabe. Was nicht überrascht, da der Behandlungszeitraum deutlich länger war und sich so der Einfluss von E₂ potenzieren konnte. Mit Hilfe der *real time* PCR-Analyse konnte geklärt werden, welchen Einfluss die Behandlungsdauer auf die Regulation der Genexpression hat. Vergleicht man die Regulation der mRNA-Expression der beiden ER-Subtypen *Esr1* bzw. *Esr2* nach beiden Behandlungszeiträumen mit E₂, so unterscheiden diese sich deutlich bezüglich der Richtung der Expression. In der Literatur wird beschrieben, dass eine E₂-Behandlung bei *Esr1* im Uterus zu einer verringerten Expression führt (239). Diese konnte zwar nach der 21-tägigen Behandlungsdauer beobachtet werden, nicht aber nach der dreitägigen. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch bei der Expression in den Genen *Pgr* und *Clu* (Abb. 4.28 und 4.43). In beiden Fällen ist die mRNA-Expression der Gene *Pgr* bzw. *Clu* im Uterus nach der dreitägigen Behandlung erhöht und nach der 21-tägigen Behandlung verringert. In der Literatur finden sich Studien mit längerfristig E₂-behandelten ArKO-Mäusen, bei denen *Pgr* wie auch *Ltf* im Uterus eine niedrige Expression aufweisen (104). Dies fügt sich insofern in bekannte Literaturdaten, da in den Uteri der αERKO-Mäuse keine Erhöhung der mRNA-Spiegel für *Pgr* und *Ltf* nach einer E₂-Behandlung nachgewiesen wurde (273,274). Ein ähnliches Ergebnis konnte nach der E₂-Behandlung in den Uteri der AF2ERKI-Mäuse festgestellt werden, da es auch hier zu keiner erhöhten mRNA-Expression von *Ltf* kam (232). Anders verhielt es sich in den Uteri der ArKO-Mäuse bei der Expression des Gens *Ltf*. Hier wurde nach beiden Behandlungszeiträumen eine durch E₂ erhöhte mRNA-Expression des *Ltf* in den ArKO-Mäusen nachgewiesen. Lediglich die Intensität der Ausprägung zwischen den beiden Behandlungszeiträumen unterschied sich dahingehend, dass die länger behandelten Tiere auch eine höhere Expression des *Ltf* im Uterus aufwiesen. So sind bereits nach der Behandlung mit E₂ deutliche Unterschiede zu erkennen.

Die Gene mit einer möglichen molekularen Verknüpfung zwischen MetS und Östrogendefizienz wie *Pparg* und *Il6* werden zwar nach beiden Behandlungszeiträumen im Uterus in die gleiche Richtung exprimiert, lediglich das Ausmaß der Expression unterscheidet sich zum Teil sehr drastisch, so z. B. beim *Pparg* um das bis 4-fach (Abb. 4.29 und 4.44). Jeweils nach der 21-tägigen Behandlung kann die stärkere Ausprägung der Expression beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier die längere Behandlungsdauer Einfluss nimmt.

Raloxifen

Raloxifen ist ein synthetischer, nicht steroidaler SERM. Verwendung findet Raloxifen primär in der Behandlung und Prävention der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen. Studien zeigten, dass Raloxifen neutrale Effekte gegenüber dem Uterus besitzt (270,275).

Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass es nach einer dreitägigen Behandlung mit Raloxifen zu einer Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes in ArKO-Mäusen kam (Abb. 4.24). Diese Beobachtung ist außergewöhnlich, da sie zum einen den Literaturodaten widerspricht zum anderen der Effekt ausschließlich nach der dreitägigen Behandlung gezeigt wurde. Erlandsson *et al.* konnten nach der Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit dem Raloxifen-Analogon LY117018 in ovx Tieren ebenfalls eine Östrogenität nachweisen, dafür wurden in diesem Fall die Tiere für 2,5 Wochen behandelt (276). Die Behandlung mit LY117018 in den *sham*-operierten Tieren zeigte eine Verringerung des Uterusgewichtes. Black *et al.* stellten für Raloxifen (LY139481 HCl) eine konzentrationsabhängige Östrogenität fest (270).

Die auf den Gewichtsdaten aufbauenden Resultate der mRNA-Expression zeigten für Raloxifen im Uterus ein Expressionsmuster dahingehend, dass die Dauer der Behandlung keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene nahm. Einzig die Expression von *Esr2* zeigte eine inverse Regulation, da es nach dreitägiger Gabe von Raloxifen zu einer Stimulation und nach der 21-tägigen Behandlung zu einer Repression der mRNA vom *Esr2* im Uterus kam. Bei weiblichen ovariectomierten CF1-Mäusen konnte beobachtet werden, dass eine kurze Behandlung mit Raloxifen zu einer verringerten

Expression des *Esr1* im Uterus führt und zu einer erhöhten mRNA-Expression des *Esr2* (277). Dies konnte bei ArKO-Mäusen so nicht bestätigt werden.

Nach der Behandlung mit Raloxifen wurden im Uterus der ArKO-Maus östrogene (*Esr2*) als auch antiöstrogene Eigenschaften (*Clu*, *Ltf*, *Il6*) beobachtet, wobei die antiöstrogenen Eigenschaften überwogen. Alle untersuchten Gene mit einer Verbindung zwischen Östrogendefizienz und MetS (*Pparg*, *Il6*, *Tnfa*) unterschieden sich nach der Behandlung mit Raloxifen zum Teil sehr stark in ihrer Regulation der mRNA-Expression verglichen mit einer östrogenen Expression. Im Uterus zeigte sich nach beiden Behandlungsdauern mit Raloxifen eine E₂-ähnliche Regulation nur für das Gen *Esr2*.

Diese Daten suggerieren, dass Raloxifen auf den Uterus der ArKO-Maus nur ein niedriges Niveau von Östrogenität ausübt. Diese Ergebnisse decken sich mit unterschiedlichen Literaturdaten, die zu derselben Aussage nach *in vivo* Studien mit Ratten kamen (278,279).

Genistein

Die weiblichen ArKO-Mäuse wurden mit dem natürlich vorkommenden Soja-Isoflavonoid Genistein behandelt. Dabei konnte in vorangegangenen Studien festgestellt werden, dass es zu einer dosisabhängigen Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes bei oral mit Genistein supplementierten Ratten kam (280,281,123,282,283). Stand den Tieren ein phytoöstrogenfreies Futter *ad libitum* zur Verfügung und wurden sie auf dieser Basis subkutan mit Genistein behandelt, konnten wiederum keine Effekte auf die Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes nachgewiesen werden (123). Bei Versuchen mit ovariectomierten C57BL/6-Mäusen zeigte die orale Behandlung mit Genistein ebenfalls keinen Einfluss auf das Uterusgewicht (284). Diese Ergebnisse sind konform zu Studien mit ArKO-Mäusen, bei denen ebenfalls keine Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes nach der Behandlung mit Genistein beobachtet werden konnten (285). Mit den beiden tierexperimentellen Studien TV 3 und TV 4 konnte die Aussage verifiziert werden, dass Genistein keinen Einfluss auf das Uterusfeuchtgewicht zu haben scheint (Abb4.24 und 4.39). Dies war unabhängig davon wie lange die Tiere behandelt wurden. Da allerdings nur eine Dosis untersucht wurde, bleibt die Frage offen, welche Effekte bei anderen

Konzentrationen beobachtet werden könnten. Bekannt ist, dass Genistein eine höhere Bindungsaffinität zu ER β als zu ER α zeigt, letzterer aber primär im Uterus exprimiert wird. Damit bietet sich ein Erklärungsansatz, warum eine Behandlung mit Genistein kaum Einfluss auf das Uterusfeuchtgewicht hat. Weiterhin kann die Wirkung von Genistein nicht nur über den ER β und ER α erfolgen, sondern auch über einen Tyrosin-Kinase-Signalweg (286). Ist doch die bekannteste Aktivität des Genistein die Inhibierung des Tyrosin-Kinase-Signalwegs in vielen Gewebetypen, was unter anderem in einer verlangsamten Tumorgenese endet (287–289).

Bei der Bewertung der mRNA-Expressionsdaten nach der Behandlung mit Genistein im Uterus der ArKO-Maus fällt auf, dass die Dauer der Behandlung sich entweder kaum in den Expressionsspiegeln der Gene widerfinden ließ (*Esr1*, *Ltf*) oder eine inverse Expression auftrat (*Esr2*, *Clu*, *Il6*). Dabei wurde die Expression der mRNA von *Il6* und *Clu* nach der dreitägigen Gabe verringert und nach der 21-tägigen Behandlung stimuliert (Abb. 4.28, 4.29, 4.43, 4.44). Die Verwendung von Genistein im drei-Tage uterotrophen Assay als auch nach den 21-Tagen Behandlung führte im Fall für die Expression der mRNA des *Esr1* zu einer erhöhten Expression. Dies steht im Widerspruch zu publizierten *in vivo* Studien, bei denen Ratten unter Genistein-Gabe eine verminderte Expression des *Esr1* aufwiesen (290). Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis, dass die mRNA des *Pgr* im Uterus von ArKO-Mäusen nach einer Genisteinbehandlung verringert exprimiert wird (Abb. 4.28 und 4.43). Studien in Ratten allerdings stellten eine erhöhte Expression des *Pgr* fest (123,291). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass es sich für die beiden östrogenresponsiven Gene *Esr1* und *Pgr* um ArKO-Maus spezifische Effekte handeln muss, da die anderen Studien sich auf Daten von Ratten stützen. Angemerkt sollte aber auch werden, dass bei Genen ohne ERE wie *Clu* die Wirkung von Genistein deutlich geringer ausgeprägt ist (292).

Des Weiteren zeigten die Untersuchungen im Uterus der mit Genistein behandelten Tiere kaum östrogene Eigenschaften im Hinblick auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene. Es konnten neben wenigen östrogenen Effekten, wie sie z. B. im *Esr2* (Abb. 4.27 und 4.42) beobachtet wurden, eine Vielzahl an nicht-östrogenen Effekten beschrieben werden (*Esr1*, *Pgr*, *Clu*, *Il6*). Auf Grundlage der Daten, die nach der Behandlung mit

Genistein erhoben wurden, kann festgestellt werden, dass durch dieses Soja-Isoflavonoid östrogenähnliche Eigenschaften nur auf einem sehr geringen Niveau im Uterus der ArKO-Maus vorhanden sind. Diese Ergebnisse gehen konform mit anderen Studien, die bereits zeigen konnten, dass Isoflavonoide abhängig von der Konzentration und des hormonellen Hintergrundes des Organismus östrogene als auch antiöstrogene Eigenschaften besitzen (293–295).

8-Prenylnaringenin

8-PN als eines der wirksamsten Phytoöstrogene wies nach der 21-tägigen Behandlung kein verändertes Uterusfeuchtgewicht auf. Diese Beobachtung ist auffällig, da eine Wirksamkeit *in vivo* durch Miyamoto *et al.* in ovx Ratten nachgewiesen wurde (140). In zeitabhängigen Versuchen mit 8-PN behandelten ovx Ratten konnte gezeigt werden, dass die Effekte von der Dauer der Behandlung abhängig waren. So wurde beobachtet, dass das Uterusfeuchtgewicht nach einer Behandlungsdauer von 7, 24 und 72 Stunden mit 8-PN signifikant erhöht war (235). Die Effekte von 8-PN auf den Uterus im Zuge des Zeitabhängigkeits-Versuches traten nach einer vergleichsweise kurzen Zeit ein (235). 8-PN wird als ein über den ER α wirksames Phytoöstrogen beschrieben (144). Bei Transaktivierungs-Studien konnte gezeigt werden, dass 8-PN einer der stärksten pflanzlichen ER α -Agonisten ist (144). *In vitro* zeigte sich eine vergleichbare Östrogenität wie sie dem Östron nachgewiesen wurde (144). Andere Studien wiederum zeigten keine Unterschiede der Bindungsaffinität von 8-PN zu ER α und ER β (142).

Bei der mRNA-Expression der untersuchten Gene im Uterus konnte deutlich die Behandlungsdauer unterschieden werden. Auffallend dabei ist, dass erst nach der 21-tägigen Behandlung die Regulation der Genexpression gezeigt werden konnte wie sie in der Literatur beschrieben wird (235). Beispielhaft sei hier die auf die Expression der Gene *Esr1* und *Pgr* hingewiesen. Für beide Gene konnte eine inverse Regulation der mRNA-Expression im Bezug zur Behandlungsdauer festgestellt werden, während die mRNA des *Pgr* im Uterus nach der dreitägigen Behandlung signifikant niedriger exprimiert wurde, konnte nach der 21-tägigen Behandlung eine erhöhte Expression beobachtet werden (Abb. 4.28 und 4.43). Ein weiteres Resultat dieser Arbeit ist die

Tatsache, dass 8-PN auf die mRNA-Expression im Uterus der ArKO-Mäuse nur eine sehr geringe östrogene Wirkung ausübt. Dabei stechen besonders die östrogenresponsiven Gene (*Esr1*, *Ltf*, *Pgr*) hervor. Dies scheint offensichtlich ein Effekt des ArKO-Mausmodells zu sein, da in der Literatur für diese Gruppe von Genen (Tab. 1.3) eine Östrogenität durch 8-PN beschrieben wurde (143,235).

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der mRNA-Expression für die Testsubstanzen Raloxifen, Genistein und 8-PN im Uterus der ArKO-Mäuse nur ein sehr geringes Niveau an östrogenen Wirkung nachweisen. Dieser Nachweis ist besonders für 8-PN erstaunlich, da es in der Literatur als östrogen wirksame Substanz für den Uterus beschrieben wird.

Für den Uterus der ArKO-Mäuse lässt sich weiterhin ergänzend feststellen, erst eine längerfristige Gabe östrogenen Substanzen führt zu den Effekten im Uterus der ArKO-Maus die denen in der Literatur besprochenen Mäuse entsprechen. Diese Effekte konnten hinsichtlich der Regulation östrogenresponsiver Gene gemacht werden, weniger bei den Genen, die eine mögliche molekulare Verknüpfung von MetS und der Östrogendefizienz darstellen. So lässt sich vermuten, dass erst eine längerfristige Substitution mit östrogenähnlichen Substanzen die bekannten physiologischen Effekte als auch die zu erwartenden Expressionsmuster aufweist. Ein Grund dafür könnte die bei der ArKO-Maus bereits lebenslang vorhandene Östrogendefizienz sein, da so ein verlangsamtes Ansprechen des E₂ erklärbar wäre. Dies lässt sich allerdings am besten nachweisen, wenn entsprechende Hormonspiegel bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies aus Mangel an notwendigem Probenmaterial nicht durchgeführt werden. Die Annahme hinter dieser Theorie ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Für den Uterus werden sogenannte schnelle und langsame E₂-Antworten beschrieben. Zum schnellen E₂-Response des Uterus zählt man unter anderem die erhöhte RNA-Polymeraseaktivität und die Synthese von Enzymen. Nach der E₂-Substitution treten verzögert eine zelluläre Hypertrophie auf, ebenso wie eine erhöhte Protein- und RNA-Synthese.

Für den Uterus der ArKO-Mäuse lassen sich daher zwei Theorien aufstellen:

- a) Es bedarf einer bestimmten Substanzschwelle im Körper der ArKO-Maus, um östrogenähnliche Wirkungen in der mRNA-Expression auszulösen. Dazu könnte auch ein kurzer Behandlungszeitraum ausreichen.
- b) Die ArKO-Maus muss über einen längeren Zeitraum mit der östrogenähnlichen Substanz behandelt werden, um östrogene Einflüsse in der Genexpression des Uterus aufzuweisen, so würde sich auch erklären, warum im Rahmen dieser Arbeit die bekannten Effekte meist erst nach der längeren Behandlungszeit auftraten.

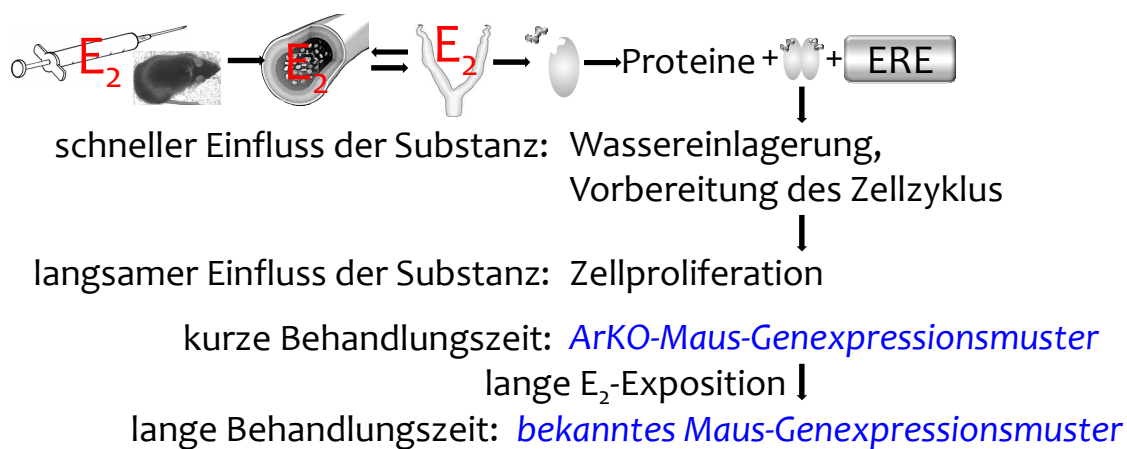


Abb. 5.1 *hypothetischer Mechanismus des Einflusses von E_2 im Uterus von ArKO-Mäusen*
 modifiziert nach (296)

5.2.2 Fettgewebe

Das Fettgewebe spielt unter anderem eine wichtige Rolle beim Stoffwechsel der Geschlechtshormone. Der größte Ort der peripheren Aromatisierung von Androgenen in Östrogene nach der Menopause ist das Fettgewebe (297). Da eine positive Korrelation von Fettgewebe und Aromataseaktivität besteht, ist es erklärbar, warum die Konzentrationen von Östron und Östradiol im Fettgewebe höher als im Plasma sind (298). *In vitro* und *in vivo* Studien wiesen nach, dass die Östrogenrezeptoren an der Modulation und Verteilung des Fettgewebes beteiligt sind (299).

Im Fettgewebe werden beide Östrogenrezeptoren exprimiert. Untersuchungen in α ERKO-Mäusen haben gezeigt, dass der ERα im Besonderen an der Fettumverteilung

beteiligt ist. Während α ERKO-Mäuse 50 - 100 % mehr Fettgewebe besitzen als die WT-Mäuse (226,300,301) konnte bei den β ERKO-Mäusen keine Akkumulation von Fettgewebe beschrieben werden (302,303). In der ArKO-Maus werden im Gegensatz zu den α ERKO- und β ERKO-Mäusen zwar beide Östrogenrezeptoren exprimiert, aber ihnen fehlt das Hormon, um den Hormon-Rezeptor-Komplex zu bilden, damit eine östrogene Wirkung zu erzeugt werden kann. Dadurch wird aufgrund des Östrogenmangels in der ArKO-Maus ebenfalls eine Fettgewebeakkumulation beobachtet, da eine über den ER α vermittelte Transkription ausbleibt (115,116). Eine Behandlung mit Östrogen bzw. Substanzen wie Raloxifen, Genistein und 8-PN führte in den ArKO-Mäusen nach beiden Behandlungszeiträumen zu einer Verringerung des infrarenalen Fettgewebes (Abb. 4.25 und 4.40). Dabei zeigte sich nach der dreitägigen Behandlung von ArKO-Mäusen eine Verringerung des Gewichtes des infrarenalen Fettgewebes um das 1,7-2,4-fache, während sich nach der 21-tägigen E₂-Behandlung das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes um das 1,42-fache verringerte.

Signifikante physiologische und biochemische Veränderungen des metabolischen Phänotyps treten erst nach einer längerfristigen Behandlung mit östrogenwirkenden Substanzen auf. Derartige Veränderungen sind die Abnahme der Fettgewebemasse durch eine Verringerung der Fettzellen (304) und eine Verringerung des Serumleptin-Spiegels. Eine Umstellung des Fettgewebemetabolismus bedarf einer gewissen Zeit, es erscheint daher plausibel, dass die signifikanten physiologischen Veränderungen erst in der 21-tägigen Behandlungsdauer einsetzen.

Infrarenales Fettgewebe

Durch die Abnahme der Masse des infrarenalen Fettgewebes in den östrogenbehandelten Tieren nach beiden Behandlungszeiträumen und in allen Behandlungsgruppen lässt sich auch die Reduktion des Körpergewichtes erklären. Auf diese Weise wurde die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass östradiolähnliche Substanzen einen reduzierenden Einfluss auf das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes haben, mit dieser Arbeit bestätigt (132,304,305). Fettgewebe ist in der Lage, durch Unterbindung der Adipogenese und durch Induktion von Apoptose in den Adipozyten

reduziert zu werden (306). Es ist bekannt, dass durch eine Behandlung mit E_2 die Fettzellen verkleinert werden, wodurch auch das Körpergewicht gesenkt wird (304).

Im Zuge der Bewertung der Genexpressionsdaten konnte festgestellt werden, dass es zum Teil zu unterschiedlichen mRNA-Expressionsspiegeln nach den beiden Behandlungszeiträumen mit E_2 gekommen ist. Zeigten die östrogenregulierten Gene *Esr1* und *Clu* nach der dreitägigen Behandlung mit E_2 im infrarenalen Fettgewebe keine Veränderung bei der mRNA-Expression, wirkte sich die 21-tägige Behandlung durch eine Stimulation der Expression für den *Esr1* und einer Repression für *Clu* aus (Abb. 4.34 und Tab. 4.1). Neben einer inversen Regulation der mRNA-Expression (*Il6*) stand auch das Ausmaß der mRNA-Expression (*Pparg*, *Il6ra*) für einen Teil der Gene mit einer molekularen Verbindung zwischen Östrogendefizienz und Mets unter dem Einfluss der Behandlungsdauer. Dabei unterschied sich die Größe der Expression für den *Pparg* um 2-fache und für den *Il6ra* um beinahe das 1,4-fache nach der E_2 -Behandlung im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren (Abb. 4.37 und 4.48).

Im Einklang mit den Literaturdaten für das Fettgewebe stehen dabei primär die Expressionsprofile von *Esr1* und *Srebp* nach der 21-tägigen Behandlung mit E_2 (307).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die veränderte Expositionszeit Grund für die unterschiedliche Regulation der Genexpression sein könnte. Eine andere Vermutung ist, dass der genetisch bedingte Mangel an E_2 in den ArKO-Mäusen verantwortlich für die unterschiedliche Regulation der Expressionen ist. Am wahrscheinlichsten ist eine Kombination aus beidem.

Raloxifen

Nach den Behandlungen der ArKO-Mäuse mit dem SERM Raloxifen konnte für das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes im Vergleich zu den unbehandelten Tieren nach beiden Behandlungszeiträumen eine Verringerung festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die dreitägige Gabe mit Raloxifen eine stärkere reduzierende Wirkung auf das infrarenale Fettgewebe ausübte als die 21-tägige Behandlung (Abb. 4.25. und 4.40). Ähnliche östrogene Einflüsse konnten bereits bei Ratten beschrieben werden, die nach einer Ovariectomie unter anderem mit Raloxifen behandelt wurden (308). Zusätzlich

konnte in dieser Studie eine signifikante Gewichtsverringerung des Fettgewebes im Vergleich zu den ovx Tieren beobachtet werden (308). Dies lässt den Schluss zu, dass Raloxifen auf das Gewicht des infrarenalen Fettgewebes der ArKO-Mäuse einen östrogenen Einfluss hat, da auf physiologischer Ebene östrogenähnliche Ergebnisse beobachtet werden konnten.

Mit Hilfe der DNA-Quantifizierung konnte für einen Teil der Gene ein Einfluss der Behandlungsdauer nachgewiesen werden. Ein Expressionsunterschied durch den Einfluss der Behandlung ließ sich unter anderem in den Genen *Esr1*, *Clu*, *Il6* und *Il6ra* beobachten. Dabei unterschieden sich *Esr1*, *Clu* und *Il6* im Ausmaß der Expression (Abb. 4.34, 4.35, 4.37, 4.48 und Tab. 4.1), während der *Il6ra* eine inverse Regulation aufwies (Abb. 4.37 und 4.48). Kein Einfluss der Behandlungsdauer konnte in der Regulation der Gene mit einer Verbindung zum MetS (*Lepr*, *Insr*) aufgezeigt werden. Was die Vermutung nahe legt, dass Raloxifen im infrarenalen Fettgewebe der ArKO-Maus trotz längerer Behandlungsdauer keinen größer werdenden Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat als nach der dreitägigen Behandlung. Um dies zu verifizieren, bedarf es allerdings zum einen noch der Überprüfung weiterer Gene wie z.B. Resistin oder Adiponektin und einer bewertenden Betrachtung von Proteinexpressionsdaten.

Für die Regulation der mRNA-Expression konnte nur ein sehr geringer östrogenen Einfluss von Raloxifen gezeigt werden. Die Mehrheit der untersuchten Gene zeigten keine Östrogenität nach der Raloxifenbehandlung (*Esr1*, *Lepr*, *Insr*).

Für Raloxifen liegt somit nahe, dass es ein geringes östrogenes Potenzial auf physiologische Parameter wie auch auf die Regulation der Gene aufweist.

Genistein

Ein Verabreichen des Soja-Isoflavonoids Genistein wirkt sich auf das infrarenale Fettgewebe mit einer deutlich stärkeren Abnahme nach der dreitägigen als nach der 21-tägigen Behandlung aus. Durch mehrere Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Genistein sich dosisabhängig auf das Gewicht des Fettgewebes mit einer Verringerung auswirkt (131,309,310). Dabei wird die Fettzelle kleiner, da Genistein einen hemmenden Effekt auf die Lipoproteinlipase (LPL) ausübt (309).

Der Einfluss der Behandlungsdauer wirkte sich auch zum Teil auf die Regulation der Genexpression im infrarenalen Fettgewebe der mit Genistein behandelten Tiere aus. Es wurden z.B. inverse Regulationen der Expression (*Il6ra*) (Abb. 4.37 und 4.48) nachgewiesen wie auch eine sich im Ausmaß unterscheidende Expression (*Pparg*, *Il6*) (Abb. 4.37 und 4.48). Damit konnte auf Ebene der mRNA-Expression ein Einfluss der Behandlungsdauer konstatiert werden.

In Tierversuchen mit Mäusen wurde bereits für Genistein ein östrogenen Einfluss auf die Regulation der Genexpression im Fettgewebe bestätigt (131). Mit den Expressionsprofilen der ArKO-Mäuse, die in dieser Arbeit erhoben wurden, kann diese Aussage bestätigt werden. Für die meisten untersuchten Gene wurde nach der Genisteinbehandlung eine östrogenähnliche mRNA-Expression bekräftigt (*Esr1*, *Clu*, *Insr*, *Pparg*). Dies geht konform mit Daten aus der Literatur, die ebenfalls zeigten, dass die Gene *Esr1*, *Esr2*, *Lep* und *Pparg* nach der Behandlung mit Genistein im Fettgewebe eine östrogene Expression aufwiesen (131).

Die erhobenen Daten bestätigen den Eindruck, dass der Einfluss des Genistein auf das infrarenale Fettgewebe in ArKO-Mäusen stark von der Behandlungsdauer abhängt. Weiter kann mit diesen Ergebnissen die Annahme bekräftigt werden, dass Genistein einen östrogenen Einfluss auf das infrarenale Fettgewebe der ArKO-Mäuse ausübt.

8-Prenylnaringenin

8-PN gehört zu einem der wirksamsten Phytoöstrogene (141). Seine dem E₂ vergleichbare Wirksamkeit konnte durch *in vivo* Studien an ovx Ratten auf den Uterus als auch auf die Knochendichte gezeigt werden (140,311). Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Wirksamkeit des 8-PN auf das Fettgewebe beschäftigen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 8-PN zu einer 2-fachen Verringerung des infrarenalen Fettgewebes führt. Interessanterweise konnte man diesen Effekt schon nach der dreitägigen Behandlung sehen. Er wurde aber nicht durch eine längere Behandlung verstärkt. Festgestellt werden kann daher, dass 8-PN im infrarenalen Fettgewebe eine östrogene Wirksamkeit aufweist. Dabei scheint es bedeutungslos wie lange die Tiere behandelt wurden, da der Einfluss des 8-PN auf das

Gewicht des Fettgewebes nach einer längeren Behandlungszeit sich nicht stärker ausprägt.

Die beschriebene Unabhängigkeit der Behandlungsdauer des 8-PN konnte auf molekularer Ebene nicht verifiziert werden. Hier wurde deutlich der Einfluss der Behandlungszeit nachgewiesen. Dies äußerte sich entweder in einer inversen Expression der mRNA (*Tnfa*) oder dem Ausmaß der Expression (*Pparg*, *Il6*) (Abb. 4.37 und 4.48).

Ein eindeutiger östrogener Einfluss, wie er sich im Gewicht des infrarenalen Fettgewebes nachweisen ließ, lässt sich durch die Regulation der Genexpression nicht bestätigen. Es scheint eher so, als ob sich nach der dreitägigen Behandlung ein nicht-östrogener Einfluss auf die Expression der Gene auswirkt (*Il6*, *Pparg*), während nach der 21-tägigen Behandlung die östrogene Wirkung auf die Expression der Gene überwog (*Il6*, *Pparg*) (Abb. 4.37 und 4.48).

Daher kann spekuliert werden, dass die Behandlungsdauer determiniert, ob 8-PN auf das infrarenalen Fettgewebe der ArKO-Maus eine östrogene oder nicht-östrogene Wirkung hat.

Welchen Einfluss ein Teil der erhobenen mRNA-Expressionsdaten im infrarenalen Fettgewebe hat, soll im folgen Abschnitt umrissen werden.

Pparg als einer der Schlüsselfaktoren für die Fettzelldifferenzierung (312) ist beteiligt an der Fettsäure-Speicherung sowie dem Glucose-Metabolismus. Der aktivierte *Pparg* trägt so zur Stimulierung der Lipid-Aufnahme und Adipogenese bei. Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen im infrarenalen Fettgewebe zeigten aber, dass der *Pparg* nach beiden Behandlungszeiten durch alle Testsubstanzen verglichen zu den unbehandelten Tieren zu einem gewissen Grad herunterreguliert wurde. Was insofern mit den physiologischen Daten übereinstimmt, da eine verringerte Expression des *Pparg*, eine verringerte Adipogenese nach sich zieht, wodurch es final zu einer verringerten Fettgewebemasse kommt. Das Fettgewebe ist weiterhin ein wichtiger Ort der Insulinwirkung und trägt so zur Energiehomöostase bei. Mit dem GLUT4 gelangt die Glukose in die Zelle. Dieser Prozess ist vom Insulin gesteuert, das heißt je höher der Insulinspiegel, desto mehr Glukose kann über den GLUT4 in die Zelle gelangen. Studien

zeigten, Flavonoide können die Glukoseaufnahme in Adipozyten verändern (313). Dabei kann die Glukoseaufnahme nach einer Insulin-Stimulation auf den Grundzustand herabgesetzt werden (313). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach der Behandlung mit Raloxifen und Genistein nur eine leicht erhöhte mRNA-Expression des *Glut4* nachgewiesen. Die Gene *Insr*, *Insig1*, *Insig2* und *SREBP* sind ebenfalls in den Glucose-Stoffwechsel der Adipozyten involviert (314) und somit auch indirekt an der Zu- bzw. Abnahme vom Gewicht des Fettgewebes. Infolgedessen findet man im Adipösen eine Überexpression von *Srebp* im Fettgewebe (315,316). Dies wiederum aktiviert die Cholesterin- und Fettsäure-Biosynthese-Wege (317). Dieser Mechanismus unterliegt dem Zusammenspiel von INSIG und SREBP. Die zelluläre Cholesterin-Konzentration wird durch einen komplexen Mechanismus kontrolliert, an dem *Insig*, SCAP und SREBP beteiligt sind. Vermittelt durch die integralen Membranproteine *Insig1* und *Insig2* wird der SCAP-SREBP-Komplex im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten (6,318,319). Eine erhöhte Expression des *Insig1* im Fettgewebe konnte bei diätinduzierter Fettleibigkeit in normalen Ratten gezeigt werden (320). Daher lässt sich vermuten, dass die Testsubstanzen auf die Expression des *Glut4* in der ArKO-Maus kaum Einfluss nehmen. So kann erklärt werden, warum sich der Glukose-Spiegel durch die Behandlungssubstanzen nicht verändert hat.

Gonadales Fettgewebe

Das Gewicht des gonadalen Fettgewebes wurde zwar aus präparationstechnischen Gründen nicht ermittelt, allerdings konnte bereits bei der Sektion ein Effekt nach den Substanzgaben dahingehend beobachtet werden, dass es zu einer visuellen Verringerung der Fettmasse kam.

Nach der E₂-Behandlung wurde eine deutliche visuelle Verringerung des gonadalen Fettgewebes wahrgenommen. Daher war es von Interesse, diesen visuellen Effekt auf Ebene der Geneexpression zu untersuchen, um eventuelle Hinweise einer Östrogenität auf das gonadale Fettgewebe zu identifizieren. So konnte festgestellt werden, dass nach der E₂-Gabe in der mRNA-Expression des *Esr1* und *Clu* keine veränderte Regulation im Vergleich zu den Kontrolltieren stattfand (Abb. 4.33). Weiterhin wurde keine

Abhängigkeit der Behandlungsdauer zwischen den drei und 21-Tage behandelten Tieren festgestellt. Für die untersuchten Gene mit einer Verbindung zur Pathogenese des MetS wurde wiederum eine deutliche Abhängigkeit der Behandlungsdauer nachgewiesen. Während einige Gene (*Lep*, *Lepr*) nach der dreitägigen Behandlung eine 2-fach erhöhte Expression aufwiesen, resultierte eine 21-tägige Behandlung mit E₂ im gonadalen Fettgewebe der ArKO-Maus für die gleichen Gene in einer 2,5-fach verringerten Expression der mRNA. Die untersuchten Gene mit einer molekularen Verbindung zwischen MetS und Östrogendefizienz zeigten keine Abhängigkeit der Behandlungsdauer in der Expression der mRNA.

Aus den Ergebnissen kann zusammenfassend formuliert werden, dass die östrogenresponsiven Gene als auch die Gene mit einer molekularen Verbindung vom Östrogendefizienz und MetS unabhängig von der Behandlungsdauer reguliert werden, ganz in Gegensatz zu den Genen mit einer Verbindung zu Pathophysiologie des MetS.

Für das gonadale Fettgewebe der mit Raloxifen behandelten ArKO-Mäuse konnte ein deutlicher Einfluss der Behandlungsdauer auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene nachgewiesen werden. Es zeigten sich wieder die beiden charakteristischen Expressionsprofile der mRNA, einerseits die inverse Expression der Gene wie z. B. bei dem Gen *Lepr*, wo es nach der dreitägigen Behandlung mit Raloxifen zu einer 4-fach höheren Expression kam verglichen mit den kontrollbehandelten Tieren, aber nach der 21-tägigen Behandlung zu einer 5-fach verringerten Expression (Abb.4.32 und 4.45). Andererseits unterschied sich auch die Stärke der Expression nach der Raloxifenbehandlung wie z. B. bei dem Gen *Il6*, welches nach der dreitägigen Behandlung um das 10-fache niedriger exprimiert wurde. Neben diesem Befund wurde auch die Östrogenität des Raloxifens auf das gonadale Fettgewebe untersucht. Bei dem Vergleich zeigte sich, dass nur für wenige der untersuchten Gene eine östrogene Wirkung nachgewiesen werden konnte (*Esr2*, *Lep*) (Abb. 4.30 und 4.32). Im Gegensatz dazu wurde für die Expression Gene *Esr1*, *Srebp*, *Pprag* kein östrogener Einfluss gezeigt.

Auf Grundlage dieser Daten kann man vermuten, dass der Einfluss von Raloxifen auf die Regulation der Genexpression des gonadalen Fettgewebes in ArKO-Mäusen von der

Behandlungsdauer determiniert wird. Es kann weiter angenommen werden, dass Raloxifen keinen oder nur einen sehr geringen östrogenen Einfluss auf das gonadale Fettgewebe der ArKO-Maus geltend machen kann.

Nach der Behandlung mit Genistein konnte für die im gonadalen Fettgewebe der ArKO-Mäuse untersuchten Gene ein Trend dahingehend beobachtet werden, dass die Expression abhängig von der Behandlungsdauer ist. Dies stellte sich zum einen in einer inversen Regulation der Gene dar (*Lep*, *Lepr*) und zum anderen in Ausmaß der Expression (*Il6*). Das Gen *Il6* z. B. wurde nach drei Tagen Behandlung um das 5-fache verringert exprimiert, während man nach der 21-tägigen Behandlung von keiner veränderten Expression im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren sprechen kann.

Dies konnte anhand der Expressionsprofile nahezu aller Gene, die einen Zusammenhang von MetS und Östrogendefizienz darstellen (*Pparg*, *Il6*, *Tnfa*), gezeigt werden (Abb. 4.33 und 4.46).

Somit kann die Theorie aufgestellt werden, dass die Wirkung von Genistein auf das gonadale Fettgewebe der ArKO-Mäuse unter dem Einfluss der Behandlungszeit steht. Wie schon im infrarenalen Fettgewebe konnte auch auf die mRNA-Expression des gonadalen Fettgewebes eine östrogene Wirkung durch Genistein suggeriert werden.

Wie schon in den zuvor besprochenen Substanzen konnte auch für 8-PN ein Einfluss der Behandlungsdauer auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene im gonadalen Fettgewebe ausgewiesen werden. Auch hier zeigte sich der Einfluss zum einen durch eine umgekehrte Expression der Gene nach der Behandlung (*Lepr*, *Insr*, *Pparg*) und zum anderen in einem unterschiedlichen Ausmaß der mRNA-Expression (*Il6*) (Abb. 4.32, 4.33, 4.45, 4.16). Um eine östrogene Wirkung ausmachen zu können, wurden die mRNA-Expressionen der untersuchten Gene nach der 8-PN-Behandlung mit denen nach der E₂-Behandlung vergleichend ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der größere Teil der untersuchten Gene ein östrogenes Expressionsprofil aufwies (*Lepr*, *Tnfa*) (Abb. 4.32, 4.33, 4.45, 4.46).

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass durch eine Behandlung mit 8-PN die mRNA-Expression unter dem Einfluss der Behandlungsdauer unterschiedlich reguliert werden kann. Weiterhin liegt nahe, dass 8-PN auf das gonadale Fettgewebe eine östrogene Wirkung hat.

5.2.3 Biochemische Marker

Mit dem Serumleptin-Spiegel besteht die Möglichkeit, Informationen über den Sättigungs-/Hungerzustand eines Individuums zu erlangen (115,116). In Studien wurde allerdings gezeigt, dass adipöse Menschen ebenfalls einen erhöhten Serumleptin-Spiegel aufweisen (257). Was sich daher erklärt, dass eine große Fettmasse zu einer erhöhten Leptinproduktion führt (257). Der Leptin-Spiegel steht dabei in Korrelation mit der Menge des Fettgewebes und fungiert als Kommunikator zwischen dem Körperfett und Hypothalamus. Ein hoher Serumleptin-Spiegel deutet dabei auf Sättigung, ein niedriger Serumleptin-Spiegel auf Hunger hin. In adipösen Menschen konnte eine sogenannte Leptinresistenz diagnostiziert werden. Dabei kann das Leptin nicht mehr an den Leptin Rezeptor binden und das Gefühl der Sättigung stellt sich nicht ein.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zum Körpergewicht stehen im Einklang mit den Beobachtungen, welche für den Serumleptin-Spiegel gemacht wurden. In diesem Fall konnte ein niedrigerer Serumleptin-Spiegel nach drei Tagen Behandlung mit Raloxifen bzw. nach 21-tägiger Behandlung mit E₂ nachgewiesen werden. Diese Resultate entsprechen denen in der Literatur, wo ovx Ratten über einen längeren Zeitraum mit E₂ bzw. Raloxifen behandelt wurden und ebenfalls eine Verringerung von bis zu 60 % des Serumleptin-Spiegels verglichen mit den ovx-Kontrolltieren beobachtet werden konnten (308).

Durch Studien wurde weiterhin gezeigt werden, dass in Tieren nach einer Ovariectomie der Leptin-Spiegel niedriger ist als in den intakten Tieren (258,321). Andere Tierversuche mit ovx Ratten konnte nach einer Behandlung mit E₂ eine Erhöhung des Leptin-Spiegels aufgezeigt (321). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den oben genannten Studien, denn nach einer Ovariectomie erhöht sich die Masse des Fettgewebes und daher wäre eine Erhöhung des Leptin-Spiegels zu erwarten. Durch Jones et al. konnte in

ArKO-Mäusen gezeigt werden, dass der zirkulierende Serumleptin-Spiegel signifikant erhöht war (115). Eine E₂-Behandlung bei ArKO-Mäusen resultierte in einem niedrigeren Serumleptin-Spiegel (Abb. 4.26 und 4.41). Dabei ist festzustellen, dass der Serumleptin-Spiegel nach der 21-tägigen Behandlung mit E₂ signifikant niedriger war als nach der dreitägigen Behandlung. Dieser offensichtlich östrogenvermittelte Trend ist auch bei Raloxifen, Genistein und 8-PN zu beobachten. Damit korrelieren die Ergebnisse des Leptin-Spiegels mit den Feuchtgewichten des infrarenalen Fettgewebes, denn auch hier konnte der Trend zur Abnahme des Fettgewebes gezeigt werden, nachdem die Tiere mit den östrogenen Substanzen behandelt wurden. Dies deckt sich mit Literaturdaten die nahelegen, dass bei erhöhter Fettmasse auch der Serumleptin-Spiegel erhöht ist und umgekehrt (322,323).

5.2.4 Fazit

Im Hinblick auf die als physiologische Parameter evaluierten Uterusfeuchtgewichte und Gewichte der infrarenalen Fettgewebe kann festgehalten werden, dass die Dauer der Behandlung einen Einfluss auf diese Gewebe ausübt. Dieser Befund konnte auch auf molekularer Ebene durch Erfassen der mRNA-Expression zum größten Teil bestätigt werden.

Des Weiteren wurden für Genistein wie auch für 8-PN SERM-ähnliche Eigenschaften beobachtet. Zeigten beide Testsubstanzen bei der Expression der untersuchten Gene im Uterus der ArKO-Mäuse kaum östrogene Eigenschaften, konnte in den beiden Fettgeweben ein östrogenes mRNA-Expressionsprofil nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich Ergebnisse, die auf eine SERM-Eigenschaft des 8-PN hinweisen (258). Dies widerspricht allerdings den Daten von Zierau *et al.*, dort wurde eine zum Teil stark verminderte Expression von *Esr1* und *Esr2* nach einer Behandlung mit 8-PN im Uterus beobachtet (205).

Welche Auswirkungen diese genregulatorischen Effekte genau haben und inwieweit sich diese auch auf Translationsebene darstellen lassen, sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind erstaunlich wenige Publikationen erschienen, welche die ArKO-Maus näher charakterisieren. Es wird zwar weithin angenommen, dass die ArKO-Maus ein adäquates Modell für hormonelle Prüfungen bei Zuständen der Östrogendefizienz sein könnte, aber fundierte Studien wurden darüber noch nicht publiziert. Zu dieser Annahme führt die Tatsache, dass die ArKO-Maus durch die Deletion des Cyp19 (Aromatase)-Gens, nicht in der Lage ist, Östrogen zu synthetisieren. Sie befindet sich so in einem dauerhaften östrogendefizienten Zustand.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten konnten zeigen, dass die ArKO-Maus, anders als ihre ovx WT-Wurfgeschwister, kein adäquates experimentelles Modell für reine Östrogenprüfungen ist. Sie scheint aber ein geeignetes Modell für molekulare Untersuchungen im Zusammenhang von Östrogendefizienz und MetS zu sein. Überdies kann ferner festgehalten werden, dass bei den ArKO-Mäusen das Lebensalter der Tiere eine entscheidende Determinante für die Östrogensensitivität ist. Dies ist insofern wichtig, wenn die Endpunkte auf Ebene von Geweben und Genen betrachtet werden, die besonders dem Alterungsprozess unterliegen bzw. die für gealterte Populationen relevant sind. Für die Regulation der Expression östrogenen Zielgene kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sich nach einer 21-tägigen Behandlungszeit ein anderes Muster für die Regulation der Genexpression im Uterus ergab als nach einer dreitägigen Behandlung. Dies bestätigt die Annahme, dass auch die Dauer der Behandlung einen großen Einfluss auf die Genexpression und die dadurch vermittelten Veränderungen der Physiologie und des Stoffwechsels hat. Zudem waren östrogenähnliche Effekte für Raloxifen, Genistein und 8-PN auf das Gewicht des Uterus und die beiden Fettgewebe offenkundig. In der Expression der untersuchten Gene konnte dies allerdings nicht so deutlich gezeigt werden.

Welchen Einfluss die Testsubstanzen auf die Proteinexpression zwischen den untersuchten Mausmodellen haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da die erhobenen Daten zum großen Teil auf Genexpressionsanalysen mittels *real time* PCR basieren. Für künftige Studien mit der ArKO-Maus sollte daher die

Bestimmung der Proteinexpression eine wesentliche Rolle spielen. Beinahe alle Funktionen des Organismus werden von Proteinen ausgeführt, welche während der Proteinbiosynthese anhand vorher gebildeter mRNA synthetisiert werden. Somit besteht ein direkter Einfluss der Behandlung auf die spätere Proteinexpression. Proteinexpressionsanalysen eignen sich besonders, da sie einen Überblick über die biologischen Antworten auf Testsubstanzen ergänzen. Mit Hilfe dieser Analysemethode lassen sich bestimmte Proteine sowohl quantifizieren als auch deren Expression im Gewebe lokalisieren.

Für weiterführende Studien sollte es von Interesse sein, neben dem Glucose-Spiegel auch den Insulin-Spiegel zu bestimmen, da so ein eventueller *Diabetes mellitus* aufgezeigt werden könnte. Die Bestimmung der Serumspiegel für IL-6 als auch des TNF α wäre auch interessant, da beide im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle spielen.

In diesem Zusammenhang könnte auch eine gezielte Auswahl von Genen rund um den Fettstoffwechsel getroffen werden, um dadurch gezieltere Untersuchungen durchzuführen. Ein mögliches Gen dafür wäre z. B. das Adiponektin. Es reguliert zusammen mit dem Leptin, dem Insulin und anderen Hormonen das Hungergefühl und die Nahrungsaufnahme und verstärkt die Wirkung des Insulins an den Fettzellen.

Im Hinblick auf eine längere Behandlungsdauer sind Strategien zur Optimierung der Verabreichung der Testsubstanzen notwendig (Verfügbarkeit des Antagonisten Fulvestrant), in die vor allem das Löslichkeitsverhalten einzelner Substanzen sowie die absoluten Substanzmengen in Betracht gezogen werden müssen. Eine Möglichkeit der Standardisierung wäre, wie eine neuere Arbeit zeigt, dass durch ein Gemisch aus Prüfsubstanz mit z. B. Cholesterin über jedes Siliconpellet dieselbe absolute Substanzmenge zum Einsatz gebracht werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Zetkin, Schaldach K. Lexikon der Medizin: Die umfassende Enzyklopädie. 1. Aufl. Fackelträger-Verlag; 2005. 2247 p.
2. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 1998 Juli;15(7):539–53.
3. Moebus S, Stang A. [The metabolic syndrome – a controversial diagnostic concept]. *Herz.* 2007 Okt;32(7):529–40.
4. Bulcão C, Ferreira SRG, Giuffrida FMA, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev.* 2006 Feb;2(1):19–28.
5. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, u. a. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006 März;290(3):F625–31.
6. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 2006 Mai;23(5):469–80.
7. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988 Dez;37(12):1595–607.
8. Ness-Abramof R, Apovian CM. Waist circumference measurement in clinical practice. *Nutr Clin Pract.* 2008 Sep;23(4):397–404.
9. Daniels SR, Greer FR. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics.* 2008 Juli;122(1):198–208.
10. Kim WY, Kim JE, Choi YJ, Huh KB. Nutritional risk and metabolic syndrome in Korean type 2 diabetes mellitus. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17 Suppl 1:47–51.
11. Pan W-H, Yeh W-T, Weng L-C. Epidemiology of metabolic syndrome in Asia. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17 Suppl 1:37–42.
12. Kohro T, Furui Y, Mitsutake N, Fujii R, Morita H, Oku S, u. a. The Japanese national health screening and intervention program aimed at preventing worsening of the metabolic syndrome. *Int Heart J.* 2008 März;49(2):193–203.
13. Sikaris KA. The clinical biochemistry of obesity. *Clin Biochem Rev.* 2004 Aug;25(3):165–81.
14. Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br. J. Nutr.* 2000 März;83 Suppl 1:S71–7.

15. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000 Juni;49(6):883–8.
16. Smith SR, Zachwieja JJ. Visceral adipose tissue: a critical review of intervention strategies. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999 Apr;23(4):329–35.
17. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2000 Dez;21(6):697–738.
18. Blüher M, Paschke R. [Visceral adipose tissue and metabolic syndrome]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2003 Okt 31;128(44):2319–23.
19. Ferris WF, Crowther NJ. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovasc J Afr.* 2011 Juni;22(3):147–54.
20. Méndez-Sánchez N, Arrese M, Zamora-Valdés D, Uribe M. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2007 Mai;27(4):423–33.
21. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, u. a. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with NAFLD. *Hepatology (Baltimore, Md.)* [Internet]. 2011 Dez 20 [zitiert 2012 Jan 26]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183689>
22. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2008 Sep;37(3):753–68, x-xi.
23. Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes.* 2010 Juli 15;1(3):76–88.
24. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dez 1;372(6505):425–32.
25. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995 Juli 28;269(5223):546–9.
26. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006;12:6–33.
27. Marette A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002 Juli;5(4):377–83.
28. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003 Dez;112(12):1796–808.

29. Schäfer K, Konstantinides SV. Update on the cardiovascular risk in obesity: endocrine and paracrine role of the adipose tissue. *Hellenic J Cardiol.* 2011 Aug;52(4):327–36.
30. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, u. a. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2002 Nov 26;106(22):2767–70.
31. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm. Metab. Res.* 2007 Mai;39(5):314–21.
32. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, u. a. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008 Juni 5;453(7196):783–7.
33. Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010 Mai 21;396(1):101–4.
34. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, u. a. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):307–12.
35. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 2001 Apr 6;276(14):11252–6.
36. Holt RIG, Hanley NA. *Essential Endocrinology and Diabetes.* 5. Aufl. Wiley-Blackwell; 2006. 288 p.
37. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* 5. Aufl. Wissenschaftliche; 1999. 868 p.
38. Silbernagl S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie.* 6. Aufl. Thieme, Stuttgart; 2003. 436 p.
39. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 2002 Jan 31;346(5):340–52.
40. Fowler RE, Fox NL, Edwards RG, Steptoe PC. Steroid production from 17alpha-hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1978 Sep;54(1):109–17.
41. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie.* Thieme, Stuttgart; 2001.
42. Petrides GL und PE. *Biochemie und Pathobiochemie.* 5. Aufl. Springer-Verlag GmbH; 1997. 1154 p.
43. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, u. a. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997 März;138(3):863–70.

44. Nussey SS, Whitehead SA. Endocrinology: An Integrated Approach. Informa Healthcare; 2001. 376 p.
45. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 1999 März;129(3):758S-767S.
46. Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Siiteri PK, MacDonald PC. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1974 März;38(3):476-9.
47. Bulun SE, Simpson ER. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994 Feb;78(2):428-32.
48. Evans CT, Corbin CJ, Saunders CT, Merrill JC, Simpson ER, Mendelson CR. Regulation of estrogen biosynthesis in human adipose stromal cells. Effects of dibutyryl cyclic AMP, epidermal growth factor, and phorbol esters on the synthesis of aromatase cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 1987 Mai 15;262(14):6914-20.
49. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci.* 1992;51(25):1953-6.
50. Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J. Immunol.* 1993 Juni 15;150(12):5219-30.
51. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988 Mai 13;240(4854):889-95.
52. Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile.* 1995;2(11):1173-308.
53. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, u. a. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dez 15;83(6):835-9.
54. McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Amlöf T, Ford J, Wright AP, Gustafsson JA. Mechanisms of transcription activation by nuclear receptors: studies on the human glucocorticoid receptor tau 1 transactivation domain. *Mutat. Res.* 1995 Dez;333(1-2):15-22.
55. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J. Intern. Med.* 1999 Aug;246(2):133-8.

56. McInerney EM, Tsai MJ, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Sep 17;93(19):10069–73.
57. Onate SA, Boonyaratankornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, u. a. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J. Biol. Chem.* 1998 Mai 15;273(20):12101–8.
58. Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, u. a. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol. Endocrinol.* 1999 Okt;13(10):1672–85.
59. Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):360–6.
60. Nilsson S, Gustafsson J-A. Estrogen receptor action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2002;12(4):237–57.
61. Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 2001;63:165–92.
62. Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998 Juni;10(3):384–91.
63. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, u. a. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 1996 Feb;3(2):206.
64. Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr. Relat. Cancer.* 2000 März;7(1):17–28.
65. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Juni 11;93(12):5925–30.
66. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996 Aug 19;392(1):49–53.
67. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, u. a. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997 Dez;82(12):4258–65.
68. Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997 Juli;82(7):2371–4.

69. Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* 1997 Feb;11(2):172–82.
70. Mauvais-Jarvis F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 2011 Jan;22(1):24–33.
71. White R, Parker M. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine Related Cancer.* 1998;5(1):1–14.
72. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, u. a. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 2001 Okt;81(4):1535–65.
73. Teyssier C, Belguise K, Galtier F, Chalbos D. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J. Biol. Chem.* 2001 Sep 28;276(39):36361–9.
74. Petz LN, Ziegler YS, Loven MA, Nardulli AM. Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2002 Dez;143(12):4583–91.
75. Qin C, Singh P, Safe S. Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology.* 1999 Juni;140(6):2501–8.
76. Dubik D, Shiu RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene.* 1992 Aug;7(8):1587–94.
77. Rishi AK, Shao ZM, Baumann RG, Li XS, Sheikh MS, Kimura S, u. a. Estradiol regulation of the human retinoic acid receptor alpha gene in human breast carcinoma cells is mediated via an imperfect half-palindromic estrogen response element and Sp1 motifs. *Cancer Res.* 1995 Nov 1;55(21):4999–5006.
78. Galien R, Garcia T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.* 1997 Juni 15;25(12):2424–9.
79. Hewitt SC, O'Brien JE, Jameson JL, Kissling GE, Korach KS. Selective disruption of ER{alpha} DNA-binding activity alters uterine responsiveness to estradiol. *Mol. Endocrinol.* 2009 Dez;23(12):2111–6.
80. Watson CS, Norfleet AM, Pappas TC, Gametchu B. Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids.* 1999 Feb;64(1-2):5–13.

81. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 Aug 4;346(3):904–10.
82. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005 März 11;307(5715):1625–30.
83. Brubaker KD, Gay CV. Estrogen stimulates protein tyrosine phosphorylation and Src kinase activity in avian osteoclasts. *J. Cell. Biochem.* 1999 Dez;76(2):206–16.
84. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Aug 30;91(18):8517–21.
85. Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, u. a. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 Juni 9;235(1):99–102.
86. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, u. a. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):6050–9.
87. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, u. a. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids.* 2010 Sep;75(8-9):603–10.
88. Cenni, Picard. Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. *Trends Endocrinol. Metab.* 1999 März;10(2):41–6.
89. Johansson L, Båvner A, Thomsen JS, Färnegårdh M, Gustafsson JA, Treuter E. The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol. Cell. Biol.* 2000 Feb;20(4):1124–33.
90. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 1997 Juni;11(6):657–66.
91. Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog. Horm. Res.* 2002;57:257–75.
92. Starcke S, Vollmer G. Is there an estrogenic component in the metabolic syndrome? *Genes Nutr.* 2006 Sep;1(3-4):177–88.
93. Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. *Semin. Reprod. Med.* 2010 Sep;28(5):426–34.

94. Di Carlo C, Tommaselli GA, Sammartino A, Bifulco G, Nasti A, Nappi C. Serum leptin levels and body composition in postmenopausal women: effects of hormone therapy. *Menopause*. 2004 Aug;11(4):466–73.
95. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 Juni;88(6):2404–11.
96. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* 2007;2007:95974.
97. Park Y-W, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch. Intern. Med.* 2003 Feb 24;163(4):427–36.
98. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Nov;83(5 Suppl):S192–203.
99. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev.* 2004 Aug;5(3):153–65.
100. Macciò A, Madeddu C, Mantovani G. Adipose tissue as target organ in the treatment of hormone-dependent breast cancer: new therapeutic perspectives. *Obes Rev.* 2009 Nov;10(6):660–70.
101. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ. Health Perspect.* 2001 Aug;109(8):785–94.
102. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ. Health Perspect.* 2003 Sep;111(12):1530–49.
103. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Juni 9;95(12):6965–70.
104. Toda K, Takeda K, Okada T, Akira S, Saibara T, Kaname T, u. a. Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *J. Endocrinol.* 2001 Juli;170(1):99–111.
105. Maffei L, Rochira V, Zirilli L, Antunez P, Aranda C, Fabre B, u. a. A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2007 Aug;67(2):218–24.

106. Lanfranco F, Zirilli L, Baldi M, Pignatti E, Corneli G, Ghigo E, u. a. A novel mutation in the human aromatase gene: insights on the relationship among serum estradiol, longitudinal growth and bone mineral density in an adult man under estrogen replacement treatment. *Bone*. 2008 Sep;43(3):628–35.
107. Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol*. 2010 Feb;61(1):126–34.
108. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, u. a. Aromatase—a brief overview. *Annu. Rev. Physiol*. 2002;64:93–127.
109. Jones MEE, McInnes KJ, Boon WC, Simpson ER. Estrogen and adiposity—utilizing models of aromatase deficiency to explore the relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2007 Sep;106(1-5):3–7.
110. Toda K, Terashima M, Kawamoto T, Sumimoto H, Yokoyama Y, Kuribayashi I, u. a. Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur. J. Biochem*. 1990 Okt 24;193(2):559–65.
111. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, u. a. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol. Rev*. 2005 Sep;57(3):359–83.
112. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, u. a. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev*. 1994 Juni;15(3):342–55.
113. Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, u. a. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*. 2000 Juli;141(7):2614–23.
114. Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998 Nov 18;252(2):445–9.
115. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Misso ML, Wreford NG, u. a. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2001 Dez;79(1-5):3–9.
116. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, u. a. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2000 Nov 7;97(23):12735–40.
117. Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2001 Dez;79(1-5):305–14.

118. Jones MEE, Boon WC, Proietto J, Simpson ER. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006 März;17(2):55–64.
119. Simpson E, Jones M, Misso M, Hewitt K, Hill R, Maffei L, u. a. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005 Mai;95(1-5):3–8.
120. Hill RA, Chua HK, Jones MEE, Simpson ER, Boon WC. Estrogen deficiency results in apoptosis in the frontal cortex of adult female aromatase knockout mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 2009 Mai;41(1):1–7.
121. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001 Juni;126(2):485–93.
122. Martin JHJ, Crotty S, Warren P, Nelson PN. Does an apple a day keep the doctor away because a phytoestrogen a day keeps the virus at bay? A review of the anti-viral properties of phytoestrogens. *Phytochemistry.* 2007 Feb;68(3):266–74.
123. Möller FJ. Exposition gegenüber diätetischen Isoflavonen während kritischer Phasen der weiblichen Entwicklung sowie deren Einfluss auf die Hormonphysiologie am Beispiel der Östrogenwirkung im Uterus [Internet]. 2010 Dez;Available from: urn:nbn:de:bsz:14-qucosa-63777
124. Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *J. Endocrinol.* 1997 Feb;152(2):159–66.
125. Lieberman S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996 Feb;81(2):850–1.
126. Zierau O, Gester S, Schwab P, Metz P, Kolba S, Wulf M, u. a. Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.* 2002 Mai;68(5):449–51.
127. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, u. a. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998 Okt;139(10):4252–63.
128. Molokanova E, Kramer RH. Mechanism of inhibition of cyclic nucleotide-gated channel by protein tyrosine kinase probed with genistein. *J. Gen. Physiol.* 2001 März;117(3):219–34.
129. Fu Z, Zhang W, Zhen W, Lum H, Nadler J, Bassaganya-Riera J, u. a. Genistein induces pancreatic beta-cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin-deficient diabetes in mice. *Endocrinology.* 2010 Juli;151(7):3026–37.

130. Liu D, Jiang H, Grange RW. Genistein activates the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function. *Endocrinology*. 2005 März;146(3):1312–20.
131. Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, Tanini A, u. a. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology*. 2006 Dez;147(12):5740–51.
132. Xia X, Weng J. Targeting metabolic syndrome: candidate natural agents. *J Diabetes*. 2010 Dez;2(4):243–9.
133. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BAJ. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J. Nutr.* 2002 Okt;132(10):3168–71.
134. Kurzer MS. Soy consumption for reduction of menopausal symptoms. *Inflammopharmacology*. 2008 Okt;16(5):227–9.
135. Setchell KDR, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003 Sep;78(3 Suppl):593S-609S.
136. Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, Hall W, Williamson G, Tetens I, u. a. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc.* 2006 Feb;65(1):76–92.
137. Dodge JA, Glasebrook AL, Magee DE, Phillips DL, Sato M, Short LL, u. a. Environmental estrogens: effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996 Okt;59(2):155–61.
138. Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB, Prince RL. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J. Nutr.* 1997 Sep;127(9):1795–9.
139. Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999 Juni;84(6):2249–52.
140. Miyamoto M, Matsushita Y, Kiyokawa A, Fukuda C, Iijima Y, Sugano M, u. a. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Med.* 1998 Aug;64(6):516–9.
141. Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, u. a. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000 Dez;85(12):4912–5.

142. Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, Rong H, u. a. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*. 2002 Feb;123(2):235–42.
143. Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, u. a. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. *Planta Med*. 2004 Jan;70(1):39–44.
144. Schaefer O, Hümpel M, Fritzemeier K-H, Bohlmann R, Schleuning W-D. 8-Prenyl naringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2003 Feb;84(2-3):359–60.
145. Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, u. a. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2005 Nov;97(3):299–305.
146. Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, u. a. Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis. *Planta Med*. 2008 Juni;74(8):794–801.
147. Cederroth CR, Nef S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2009 Mai 25;304(1-2):30–42.
148. Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*. 1999 März 26;447(2-3):287–91.
149. Setchell KD. Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J. Nutr*. 2000 März;130(3):654S–5S.
150. Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, Stephen AM, Doull J, Flamm WG, u. a. Soy isoflavones: a safety review. *Nutr. Rev*. 2003 Jan;61(1):1–33.
151. Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr*. 2003 Juni;89 Suppl 1:S45–58.
152. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med*. 2008 Okt;74(13):1656–65.
153. Vollmer G, Zierau O. [What are phytoestrogens and phyto-SERMS]. *Pharm Unserer Zeit*. 2004;33(5):378–83.
154. Somjen D, Katzburg S, Knoll E, Hendel D, Stern N, Kaye AM, u. a. DT56a (Femarelle): a natural selective estrogen receptor modulator (SERM). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2007 Mai;104(3-5):252–8.

155. Nachtigall MJ, Jessel RH, Flaumenhaft R, Nachtigall R, Yoles I, Naftolin F, u. a. The selective estrogen receptor modulator DT56a (Femarelle) does not affect platelet reactivity in normal or thrombophilic postmenopausal women. *Menopause*. 2011 März;18(3):285–8.
156. Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H. Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000 Mai;73(1-2):1–10.
157. Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat. Res.* 2005 Dez 11;591(1-2):247–63.
158. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, u. a. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Juli 17;288(3):321–33.
159. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, u. a. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 2006 Juli 13;355(2):125–37.
160. Vogel VG. Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator for reducing the risk of invasive breast cancer in postmenopausal women. *Womens Health (Lond Engl)*. 2007 März;3(2):139–53.
161. Johnston SJ, Cheung KL. Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr. Med. Chem.* 2010;17(10):902–14.
162. MGI-Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, & Mutations in Mouse & Rat [Internet]. [zitiert 2011 Nov 17];Available from: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>
163. Cidlowski JA, Muldoon TG. Sex-related differences in the regulation of cytoplasmic estrogen receptor levels in responsive tissues of the rat. *Endocrinology*. 1976 Apr;98(4):833–41.
164. Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. 1993 Juni;132(6):2371–9.
165. Teng C. Mouse lactoferrin gene: a marker for estrogen and epidermal growth factor. *Environ. Health Perspect.* 1995 Okt;103 Suppl 7:17–20.

166. Wünsche W, Tenniswood MP, Schneider MR, Vollmer G. Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. *Int. J. Cancer*. 1998 Mai 29;76(5):684–8.
167. Brown TL, Moulton BC, Baker VV, Mira J, Harmony JA. Expression of apolipoprotein J in the uterus is associated with tissue remodeling. *Biol. Reprod*. 1995 Mai;52(5):1038–49.
168. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005 Dez;19(4):525–46.
169. Rentsch J, Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 1996 Jan 22;379(1):55–9.
170. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, u. a. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996 Feb 15;379(6566):632–5.
171. Kutoh E, Boss O, Levasseur F, Giacobino JP. Quantification of the full length leptin receptor (OB-Rb) in human brown and white adipose tissue. *Life Sci*. 1998;62(5):445–51.
172. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, u. a. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1997 Dez;82(12):4144–8.
173. Reed BC, Ronnett GV, Clements PR, Lane MD. Regulation of insulin receptor metabolism. Differentiation-induced alteration of receptor synthesis and degradation. *J. Biol. Chem*. 1981 Apr 25;256(8):3917–25.
174. Klip A. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 Juni;34(3):481–7.
175. Insulin - from secretion to action - Article courtesy of the Beta Cell Biology Consortium [Internet]. [zitiert 2011 Nov 12];Available from: <http://www.betacell.org/content/articles/articlepanel.php?aid=1&pid=3>
176. Janowski BA. The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2002 Okt 1;99(20):12675–80.
177. Lee JN, Ye J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J. Biol. Chem*. 2004 Okt 22;279(43):45257–65.

178. Leichner GS, Avner R, Harats D, Roitelman J. Dislocation of HMG-CoA reductase and Insig-1, two polytopic endoplasmic reticulum proteins, en route to proteasomal degradation. *Mol. Biol. Cell.* 2009 Juli;20(14):3330–41.
179. Osborne TF. CREating a SCAP-less liver keeps SREBPs pinned in the ER membrane and prevents increased lipid synthesis in response to low cholesterol and high insulin. *Genes Dev.* 2001 Aug 1;15(15):1873–8.
180. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997 Mai 2;89(3):331–40.
181. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, u. a. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science.* 2010 Juni 18;328(5985):1566–9.
182. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, u. a. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010 Juni 18;328(5985):1570–3.
183. Nohturfft A, Zhang SC. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009;25:539–66.
184. Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... *Chem. Biol.* 1995 Mai;2(5):261–6.
185. Jones JR, Barrick C, Kim K-A, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, u. a. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 Apr 26;102(17):6207–12.
186. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, u. a. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006 Dez;58(4):726–41.
187. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 2000 Dez;130(12):3122S–3126S.
188. Kwon G, Xu G, Marshall CA, McDaniel ML. Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J. Biol. Chem.* 1999 Juni 25;274(26):18702–8.
189. Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J. Clin. Invest.* 1999 Aug;104(4):503–13.

190. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousaví A, Busà B, u. a. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011 März;15(3):267–73.
191. Povel CM, Boer JMA, Reiling E, Feskens EJM. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev.* 2011 Nov;12(11):952–67.
192. Deb S, Tessier C, Prigent-Tessier A, Barkai U, Ferguson-Gottschall S, Srivastava RK, u. a. The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin. *Endocrinology.* 1999 Okt;140(10):4442–50.
193. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 1989. 1659 p.
194. Clode SA. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 März;20(1):35–43.
195. Cohen PE, Milligan SR. Silastic implants for delivery of oestradiol to mice. *J. Reprod. Fertil.* 1993 Sep;99(1):219–23.
196. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581–5.
197. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987 Apr;162(1):156–9.
198. MacDonald RJ, Swift GH, Przybyla AE, Chirgwin JM. Isolation of RNA using guanidinium salts. *Meth. Enzymol.* 1987;152:219–27.
199. 30-2120_m.pdf [Internet]. [zitiert 2011 Nov 29];Available from: http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/30-2120_m.pdf
200. Brown T. *Gentechnologie für Einsteiger.* 3. Aufl. Heidelberg ;;Berlin: Spektrum Akad. Verl.; 2002.
201. Primer3 Input (version 0.4.0) [Internet]. [zitiert 2011 Nov 12];Available from: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
202. Oligo Analyzer [Internet]. [zitiert 2011 Nov 12];Available from: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
203. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, u. a. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Juni;12(6):996–1006.

204. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:365–86.
205. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 Mai 1;29(9):e45.
206. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
207. Grubbs FE. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics.* 1969 Feb;11(1):1–21.
208. Welch BL. The Significance of the Difference between Two Means When the Population Variances Are Unequal. *Biometrika.* 1938 Feb;29(3/4):350–62.
209. Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. *J. Endocrinol.* 2002 Nov;175(2):269–76.
210. Britt KL, Simpson ER, Findlay JK. Effects of phytoestrogens on the ovarian and pituitary phenotypes of estrogen-deficient female aromatase knockout mice. *Menopause.* 2005 März;12(2):174–85.
211. Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, u. a. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice *. *J. Bone Miner. Res.* 2007 Dez;22(12):1893–902.
212. O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee E-J, Pfaff LE, Hewitt SC, u. a. Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J. Biol. Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26683–92.
213. Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y, Mori M. Withdrawal of [corrected] estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci. Lett.* 1996 Feb 2;204(1-2):81–4.
214. Wang R, Wu M-J, Ma X-Q, Zhao Y-F, Yan X-Y, Gao Q-B, u. a. Body mass index and health-related quality of life in adults: a population based study in five cities of China. *European Journal of Public Health* [Internet]. 2011 Juni 25 [zitiert 2011 Nov 12];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705786>
215. Martin LJ, Woo JG, Morrison JA. Evidence of shared genetic effects between pre- and postobesity epidemic BMI levels. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Juli;18(7):1378–82.
216. Carey DG. Abdominal obesity. *Curr. Opin. Lipidol.* 1998 Feb;9(1):35–40.

217. Stein QP, Mroch AR, De Berg KL, Flanagan JD. The influential role of genes in obesity. *S D Med.* 2011;Spec No:12–5, 17.
218. Lobo RA. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas.* 2008 Mai 20;60(1):10–8.
219. Kaaja RJ. Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int.* 2008 März;14(1):21–5.
220. Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes (Lond).* 2008 Juni;32(6):949–58.
221. Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ. Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol.* 2009 Aug;30(3):396–404.
222. Karjalainen A, Paasilta M, Heikkinen J, Bäckström AC, Savolainen M, Kesäniemi YA. Effects of peroral and transdermal oestrogen replacement therapy on glucose and insulin metabolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2001 Feb;54(2):165–73.
223. Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM. Hormone replacement therapy, insulin sensitivity, and abdominal obesity in postmenopausal women. *Diabetes Care.* 2002 Jan;25(1):127–33.
224. Behre H. *Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie 52 Tabellen.* 2. Aufl. Stuttgart [u. a.]: Thieme; 2002.
225. Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier K-H, Wuttke W. Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone.* 2008 Nov;43(5):849–55.
226. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Nov 7;97(23):12729–34.
227. Diel P, Schmidt S, Vollmer G. In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 Sep 25;777(1-2):191–202.
228. Simpson ER. Models of aromatase insufficiency. *Semin. Reprod. Med.* 2004 Feb;22(1):25–30.
229. Ludgero-Correia A Jr, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* [Internet]. 2011 Nov 11 [zitiert 2011 Dez 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079392>

230. Emmen JMA, Korach KS. Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract. *Gynecol. Endocrinol.* 2003 Apr;17(2):169–76.
231. Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, Movérare S, Gao H, Vidal O, u. a. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *J. Endocrinol.* 2002 Aug;174(2):167–78.
232. Arao Y, Hamilton KJ, Ray MK, Scott G, Mishina Y, Korach KS. Estrogen receptor α AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011 Sep 6;108(36):14986–91.
233. Fong CJ, Burgoon LD, Williams KJ, Jones AD, Forgacs AL, Zacharewski TR. Effects of tamoxifen and ethynylestradiol cotreatment on uterine gene expression in immature, ovariectomized mice. *J. Mol. Endocrinol.* 2010 Sep;45(3):161–73.
234. Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003 Mai 7;1:40.
235. Zierau O, Kretzschmar G, Möller F, Weigt C, Vollmer G. Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008 Nov 6;294(1-2):92–9.
236. Wanda GJMK, Starcke S, Zierau O, Njamen D, Richter T, Vollmer G. Estrogenic activity of griffonianone C, an isoflavone from the root bark of *Millettia griffoniana*: regulation of the expression of estrogen responsive genes in uterus and liver of ovariectomized rats. *Planta Med.* 2007 Juni;73(6):512–8.
237. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, u. a. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* 1999 Juni 25;284(5423):2174–7.
238. Kishimoto H, Wang Z, Bhat-Nakshatri P, Chang D, Clarke R, Nakshatri H. The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1 α /CXCL12. *Carcinogenesis.* 2005 Okt;26(10):1706–15.
239. Möller FJ, Diel P, Zierau O, Hertrampf T, Maass J, Vollmer G. Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor α . *Toxicol. Lett.* 2010 Juli 15;196(3):142–53.
240. Gallo D, Zannoni GF, Fabrizi M, De Stefano I, Mantuano E, Scambia G. Comparative effects of 17 β -estradiol and phytoestrogens in the regulation of endometrial functions in the rodent uterus. *J. Endocrinol. Invest.* 2008 Jan;31(1):48–56.
241. Meseguer A, Puche C, Cabero A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 2002 Dez;34(11-12):731–6.

242. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001 Sep;45(3 Suppl):S116–24.
243. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J. Biol. Chem.* 2005 Okt 28;280(43):35983–91.
244. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87–91.
245. Bulló M, García-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernández M, Del Castillo D, Argilés JM, u. a. TNF α expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002 Mai;26(5):652–8.
246. Anghel SI, Wahli W. Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res.* 2007 Juni;17(6):486–511.
247. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, u. a. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 1997 Mai 15;99(10):2416–22.
248. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003;149:1–38.
249. Hoene M, Weigert C. The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obes Rev.* 2008 Jan;9(1):20–9.
250. Keller C, Keller P, Marshal S, Pedersen BK. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise—effect of carbohydrate ingestion. *J. Physiol. (Lond.).* 2003 Aug 1;550(Pt 3):927–31.
251. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes. Res.* 2001 Juli;9(7):414–7.
252. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal J-F, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology.* 2009 Mai;150(5):2109–17.
253. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Regulation of metabolism by estrogen signaling. *The Journal of Endocrinology* [Internet]. 2011 Apr 21 [zitiert 2011 Nov 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21511884>

- 254. Dieudonné MN, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2004 März;286(3):C655–61.
- 255. Dang Z-C, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CWGM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J. Biol. Chem.* 2003 Jan 10;278(2):962–7.
- 256. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, u. a. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 1996 Feb 1;334(5):292–5.
- 257. Friedman JM. Leptin and the regulation of body weigh. *Keio J Med.* 2011;60(1):1–9.
- 258. Shimomura K, Shimizu H, Tsuchiya T, Abe Y, Uehara Y, Mori M. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr. J.* 2002 Aug;49(4):417–23.
- 259. Colmenero CM, Patron M, Burgueño M, Sierra I. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the oral cavity: a report of 14 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1992 Juni;50(6):595–600.
- 260. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 2007 Apr;8(4):253–62.
- 261. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6–21.
- 262. Polini N, Rauschemberger MB, Mendiberri J, Selles J, Massheimer V. Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007 März 15;267(1-2):55–62.
- 263. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, u. a. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997 Okt 16;389(6652):753–8.
- 264. Shelly W, Draper MW, Krishnan V, Wong M, Jaffe RB. Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings. *Obstet Gynecol Surv.* 2008 März;63(3):163–81.
- 265. van der Schouw YT, de Kleijn MJ, Peeters PH, Grobbee DE. Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000 Juni;10(3):154–67.
- 266. Ye L, Chan MY, Leung LK. The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009 Apr 10;302(1):73–80.
- 267. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998 Feb;83(2):297–303.

268. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Okt;31(4):400–19.
269. Zittermann A. [Phytoestrogens]. *Zentralbl Gynakol.* 2003 Juni;125(6):195–201.
270. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, u. a. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 1994 Jan;93(1):63–9.
271. Galand P, Leroy F, Chrétien J. Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice. *J. Endocrinol.* 1971 Feb;49(2):243–52.
272. Owens W, Koëter HBWM. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ. Health Perspect.* 2003 Sep;111(12):1527–9.
273. Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR. Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol. Reprod.* 1998 Sep;59(3):470–5.
274. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology.* 1992 Sep;131(3):1458–66.
275. Pinkerton JV, Goldstein SR. Endometrial safety: a key hurdle for selective estrogen receptor modulators in development. *Menopause.* 2010 Juni;17(3):642–53.
276. Erlandsson MC, Jonsson CA, Lindberg MK, Ohlsson C, Carlsten H. Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice. *J. Endocrinol.* 2002 Nov;175(2):319–27.
277. Davis AM, Mao J, Naz B, Kohl JA, Rosenfeld CS. Comparative effects of estradiol, methyl-piperidino-pyrazole, raloxifene, and ICI 182 780 on gene expression in the murine uterus. *J. Mol. Endocrinol.* 2008 Okt;41(4):205–17.
278. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, u. a. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 1997 Dez 4;337(23):1641–7.
279. Robertson JFR. Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat. Rev.* 2004 Dez;30(8):695–706.
280. Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 2000 Aug;130(8):1963–70.

281. Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ. Health Perspect.* 2007 Dez;115 Suppl 1:62–8.
282. Al-Nakkash L, Markus B, Batia L, Prozialeck WC, Broderick TL. Genistein induces estrogen-like effects in ovariectomized rats but fails to increase cardiac GLUT4 and oxidative stress. *J Med Food.* 2010 Dez;13(6):1369–75.
283. Carbonel AAF, Simões RS, Santos RHBR, Baracat MCP, Simões M de J, Baracat EC, u. a. Effects of high-dose isoflavones on rat uterus. *Rev Assoc Med Bras.* 2011 Okt;57(5):534–9.
284. Erlandsson MC, Islander U, Moverare S, Ohlsson C, Carlsten H. Estrogenic agonism and antagonism of the soy isoflavone genistein in uterus, bone and lymphopoiesis in mice. *APMIS.* 2005 Mai;113(5):317–23.
285. Bliedtner A, Zierau O, Albrecht S, Liebhaber S, Vollmer G. Effects of genistein and estrogen receptor subtype-specific agonists in ArKO mice following different administration routes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010 Jan 15;314(1):41–52.
286. Rosselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller PJ, Dubey RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update.* 2000 Aug;6(4):332–50.
287. Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem. Pharmacol.* 2000 Okt 15;60(8):1051–9.
288. Boutin JA. Tyrosine protein kinase inhibition and cancer. *Int. J. Biochem.* 1994 Nov;26(10-11):1203–26.
289. Piontek M, Hengels KJ, Porschen R, Strohmeyer G. Antiproliferative effect of tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells. *Anticancer Res.* 1993 Dez;13(6A):2119–23.
290. Zin S, Kassmin N, Omar S. Phytoestrogen genistein causes downregulation of oestrogen receptor α in uterus of female Sprague Dawley rats [Internet]. [zitiert 2011 Nov 22]; Available from: <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0026/ea0026p52.htm>
291. Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IA, Lamartiniere CA. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001 Feb 28;173(1-2):135–45.
292. Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Léger J, Wang C, u. a. Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1993 März 5;268(7):5021–31.

293. Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Chen J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. *Eur J Nutr.* 2001 Aug;40(4):135–46.
294. García-Pérez MA, Noguera R, del Val R, Noguera I, Hermenegildo C, Cano A. Comparative effects of estradiol, raloxifene, and genistein on the uterus of ovariectomized mice. *Fertil. Steril.* 2006 Okt;86(4):1003–5.
295. Awoniyi CA, Roberts D, Veeramachaneni DN, Hurst BS, Tucker KE, Schlaff WD. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil. Steril.* 1998 Sep;70(3):440–7.
296. Barton HA, Andersen ME, Allen BC. Dose-response characteristics of uterine responses in rats exposed to estrogen agonists. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1998 Okt;28(2):133–49.
297. Szymczak J, Milewicz A, Thijssen JH, Blankenstein MA, Daroszewski J. Concentration of sex steroids in adipose tissue after menopause. *Steroids.* 1998 Juni;63(5-6):319–21.
298. Blankenstein MA, Szymczak J, Daroszewski J, Milewicz A, Thijssen JH. Estrogens in plasma and fatty tissue from breast cancer patients and women undergoing surgery for non-oncological reasons. *Gynecol. Endocrinol.* 1992 März;6(1):13–7.
299. Shillabeer G, Vydelingum S, Hatch G, Russell JC, Lau DC. Long-term regulation of leptin expression is correlated with adipocyte number in obese rats. *Clin Invest Med.* 1998 Apr;21(2):54–62.
300. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 2006 März;116(3):561–70.
301. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993 Dez 1;90(23):11162–6.
302. Pelzer T, Loza P-AA, Hu K, Bayer B, Dienesch C, Calvillo L, u. a. Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation.* 2005 März 29;111(12):1492–8.
303. Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, u. a. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Dez 22;95(26):15677–82.
304. Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2004 Dez;229(11):1127–35.

305. Stubbins RE, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *European Journal of Nutrition* [Internet]. 2011 Nov 1 [zitiert 2011 Nov 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042005>
306. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J. Nutr. Biochem.* 2008 Nov;19(11):717–26.
307. Lundholm L, Movérare S, Steffensen KR, Nilsson M, Otsuki M, Ohlsson C, u. a. Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* 2004 Juni;32(3):879–92.
308. Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, u. a. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2004 Juli;145(7):3115–21.
309. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, u. a. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology.* 2003 Aug;144(8):3315–20.
310. Szkudelska K, Nogowski L. Genistein—a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007 Juli;105(1-5):37–45.
311. Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W. Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment. *J. Endocrinol.* 2006 März;188(3):397–405.
312. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000 Juni 1;14(11):1293–307.
313. Claussnitzer M, Skurk T, Hauner H, Daniel H, Rist MJ. Effect of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Mai;55 Suppl 1:S26–34.
314. Krapivner S, Popov S, Chernogubova E, Hellénus M-L, Fisher RM, Hamsten A, u. a. Insulin-induced gene 2 involvement in human adipocyte metabolism and body weight regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008 Mai;93(5):1995–2001.
315. Hagen RM, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A. An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS Lett.* 2010 Juni 18;584(12):2689–98.
316. Laressergues E, Martin F, Helleboid A, Bouchaert E, Cussac D, Bordet R, u. a. Overweight induced by chronic risperidone exposure is correlated with overexpression of the SREBP-1c and FAS genes in mouse liver. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2011 Apr;383(4):423–36.

- 317. Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer RE. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J. Biol. Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36652–60.
- 318. Kast-Woelbern HR, Dana SL, Cesario RM, Sun L, de Grandpre LY, Brooks ME, u. a. Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 2004 Juni 4;279(23):23908–15.
- 319. Gong Y, Lee JN, Lee PCW, Goldstein JL, Brown MS, Ye J. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* 2006 Jan;3(1):15–24.
- 320. Dong X-Y, Tang S-Q. Insulin-induced gene: a new regulator in lipid metabolism. *Peptides.* 2010 Nov;31(11):2145–50.
- 321. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, u. a. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.* 1997 Aug;154(2):285–92.
- 322. Blüher S, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating neuroendocrine function in humans. *J. Nutr.* 2004 Sep;134(9):2469S–2474S.
- 323. Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007 Dez;14(6):458–64.

8. Anhang

8.1 infrarenales Fettgewebe TV 1

Idealerweise liegt das infrarenale Fettgewebe als abgeschlossenes Fettpolster, die Nieren umgebend, vor. Die RNA-Isolierung aus Fett brachte nach dem im Labor gängigen Trifast-Protokoll nur sehr geringe Mengen an RNA hervor. Dies wurde zum Anlass genommen ein neues RNA-Isolierungs-Protokoll für Fettgewebe zu etablieren. Die Daten des hier gezeigten TV 1 beruhen daher nur auf einer cDNA, also nur auf einem PCR-Lauf. Um das Bild für diesen Tierversuch zu vervollständigen, werden diese Daten hier trotzdem dargestellt, auch wenn eine Signifikanzbestimmung nicht möglich ist, es kann also lediglich von Trends gesprochen werden.

Tab. 8.1 Vergleich der Basiswerte ($2^{-\Delta ct}$ Werte) im infrarenale Fettgewebe zwischen den ovx WT-Mäusen und den vt ArKO.

Rotes Feld = gegenläufige Expression des entsprechenden Gens, gelbes Feld = unterschiedlich starke Expression, aber in gleiche Richtung, grünes Feld = kein Unterschied zwischen beiden Modellen

	ovx WT	ovx WT	ovx WT	ovx WT	ovx WT
vt ArKO	<i>Esr1</i>	<i>Esr2</i>	<i>Pgr</i>	<i>Ltf</i>	<i>Clu</i>
vt ArKO	<i>Lep</i>	<i>Lepr</i>	<i>Insr</i>		
vt ArKO	<i>Pparg</i>	<i>Il6</i>	<i>Il6ra</i>	<i>Tnfa</i>	
			↑↓	↑↑, ↓↓	=

Tab. 8.2 Vergleich der Genexpressionen im infrarenalen Fettgewebe zwischen den vt WT Mäusen und den ArKO E₂ Mäusen.

Rotes Feld = gegenläufige Expression des entsprechenden Gens, gelbes Feld = unterschiedlich starke Expression, aber in gleiche Richtung, grünes Feld = kein Unterschied zwischen beiden Modellen

	vt WT	vt WT	vt WT	vt WT	vt WT
ArKO E ₂	<i>Esr1</i>	<i>Esr2</i>	<i>Pgr</i>	<i>Ltf</i>	<i>Clu</i>
ArKO E ₂	<i>Lep</i>	<i>Lepr</i>	<i>Insr</i>		
ArKO E ₂	<i>Pparg</i>	<i>Il6</i>	<i>Il6ra</i>	<i>Tnfa</i>	
			↑↓	↑↑, ↓↓	=

8.2 Leber TV 1

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels im Körper und speichert Fette und Glucose in Form von Glykogen, ist also direkt oder indirekt an Prozessen des MetS und der Menopause beteiligt

Die östrogendefizienten Mäuse zeigten in ihrer Basisexpression mehr Unterschiede als Ähnlichkeiten. Dabei sind alle Indikatoren für östrogene Responsivität in den beiden Modellen unterschiedlich stark reguliert. Lediglich die Basiswerte von *Il6*, *Il6ra* und *Tnfa* sind in den beiden Modellen ähnlich stark exprimiert.

Für die relative mRNA-Expression der vehicle behandelten intakten WT-Mäuse und der E₂ behandelten ArKO-Mäuse wurde ein ähnliches Bild beobachtet. Dabei kam es bei den Genen *Lep*, *Insr*, *Il6* und *Tnfa* zu Gegenregulationen. Während ausnahmslos alle vehicle behandelten WT-Mäuse eine niedrigere Expression aufweisen im Vergleich zu den vehicle behandelten ovx WT-Mäusen, zeigen die E₂ behandelten ArKO-Mäuse eine niedrigere Expression, verglichen mit den vehicle behandelten ArKO-Mäusen. Im Fall des Gen *Lep* liegt sogar ein 200-facher Expressionsunterschied zwischen dem intakten WT-Tier und der E₂ behandelten ArKO-Maus. Die Gene *Esr1* und *Lepr* zeigen zwar in beiden Modellen eine niedrigere Expression als die dazugehörige östrogendefiziente Gruppe, aber hier ist der Ausprägung zwischen den Modellen unterschiedlich. So wird der *Esr1* in den E₂ behandelten ArKO-Mäusen um das 5-fache niedriger exprimiert als in den intakten WT-Mäusen.

8.3 Leber TV 2

Es ist bekannt, dass der Metabolismus in der Leber sich mit zunehmendem Alter verändert. Mit Hilfe dieses Tierversuches sollte überprüft ob diese Beobachtung auch bei den ArKO-Mäusen gemacht werden kann.

Mit dem TV 2 konnte gezeigt werden, dass bei der Expression der Basislevel von *Lepr* und *Il6* in der Leber altersbedingte Unterschiede vorhanden sind, da eine unterschiedlich starke mRNA-Expression stattfand. Die Gene *Esr1*, *Pparg* und *Tnfa* zeigten keine durch das Alter bedingte veränderte Geneexpression auf.

Nach einer E2-Behandlung der jung-adulten drei Monate alten ArKO-Mäuse und zwölf Monate alten ArKO-Mäusen wurde in den Genen *Esr1*, *Pparg* und *Il6* eine Gegenregulation der Expression gemessen. So zeigten diese Gene in den jung-adulten Tieren eine bis zu 1,9-fach erhöhte Expression, in den zwölf Monate alten ArKO-Mäusen eine bis zu 1,8-fach erniedrigte Expression verglichen zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die relative mRNA-Expression des *Tnfa* war für beide Altersgruppen verringert. Allerdings lag die Expression bei den jung-adulten Tieren um das 2,5-fache niedriger als zur Kontrollgruppe, während die Expression bei den zwölf Monate alten Tieren um das 5-fache erniedrigt wurde.

Nach der Behandlung Genistein konnten ebenfalls altersabhängige Unterschiede in der Regulation der Genexpression in der Leber festgestellt werden. Eine inverse Regulation findet in den Genen *Esr1*, *Lepr* und *Il6* statt. Dabei kann auch hier beobachtet werden, dass für diese Gene die drei Monate alten Tiere eine bis zu 3-fach erhöhte Expression aufweisen, während für die zwölf Monate alten Tiere eine 1,6-fach verringerte relative mRNA-Expression gemessen wurde, verglichen zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die Regulation der mRNA des *Tnfa* fand zwar in beiden Altersgruppen gleichgerichtet statt, lediglich die Stärke der Expression unterschied sich. So wurde die relative mRNA-Expression des *Tnfa* bei den drei Monate alten Tieren um das 2-fache erniedrigt, verglichen zur Kontrollgruppe, während die Expression in den zwölf Monate alten Tieren um das 5-fache erniedrigt wurde.

8.4 Leber TV 3

Die östrogenresponsiven Gene *Esr1* und *Clu* zeigen in der Leber lediglich nach der Behandlung von Genistein und im Fall von *Clu* auch nach der Gabe von 8-PN eine sich von der Kontrollgruppe unterscheidende Expression (Tab. 8.7). Dabei wird der *Esr1* nach der Genisteinbehandlung höher exprimiert, während *Clu* eine niedrigere Expression nach der Genistein- und 8-PN-Behandlung zeigte.

Tab. 8.3 Genexpressionen in der Leber

von *Esr1* und *Clu* nach Behandlung mit E₂, Raloxifen, Genistein und 8-PN im Vergleich zur vehicle behandelten Gruppe

↑ erhöhte Expression, ↓ niedrige Expression,
= keine Veränderung der Expression

	E ₂	Ral	Gen	8-PN
<i>Esr1</i>	=	=	↑	=
<i>Clu</i>	=	=	↓	↓

Eine E₂-Substitution zeigte bei den Genen *Lep* und *Insr* veränderte Genregulation in der Leber, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 8.1). Allerdings konnte beim *Lep* eine erhöhte Expression aufgezeigt werden (Abb. 8.1).

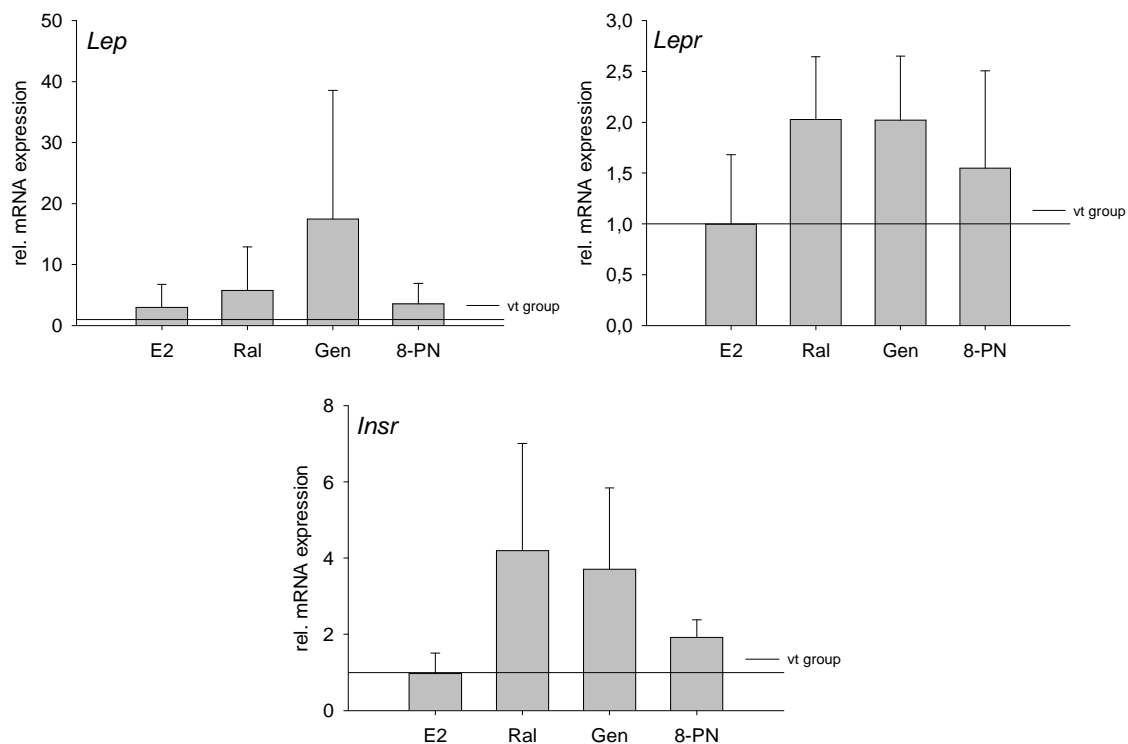


Abb. 8.1 Gene, die mit dem MetS verbunden sind in der Leber

Die relative mRNA-Expressionsspiegel von *Lep*, *Lepr* und *Insr* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Alle Gene sind normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, für die statistische Analyse wurde der Students t-Test verwendet. *p ≤ 0,05

Dabei wird *Il6ra* in der E₂- und 8-PN behandelten Gruppen signifikant niedriger exprimiert, während es keine Regulationsveränderung in den Raloxifen und Genistein behandelten Gruppen gab (Abb. 8.2). *Tnfa* wird in der Leber nach der Genisteinbehandlung signifikant niedriger exprimiert verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch kann gezeigt werden, dass *Tnfa* nach der Raloxifengabe ebenfalls eine niedrigere Expression aufweist.

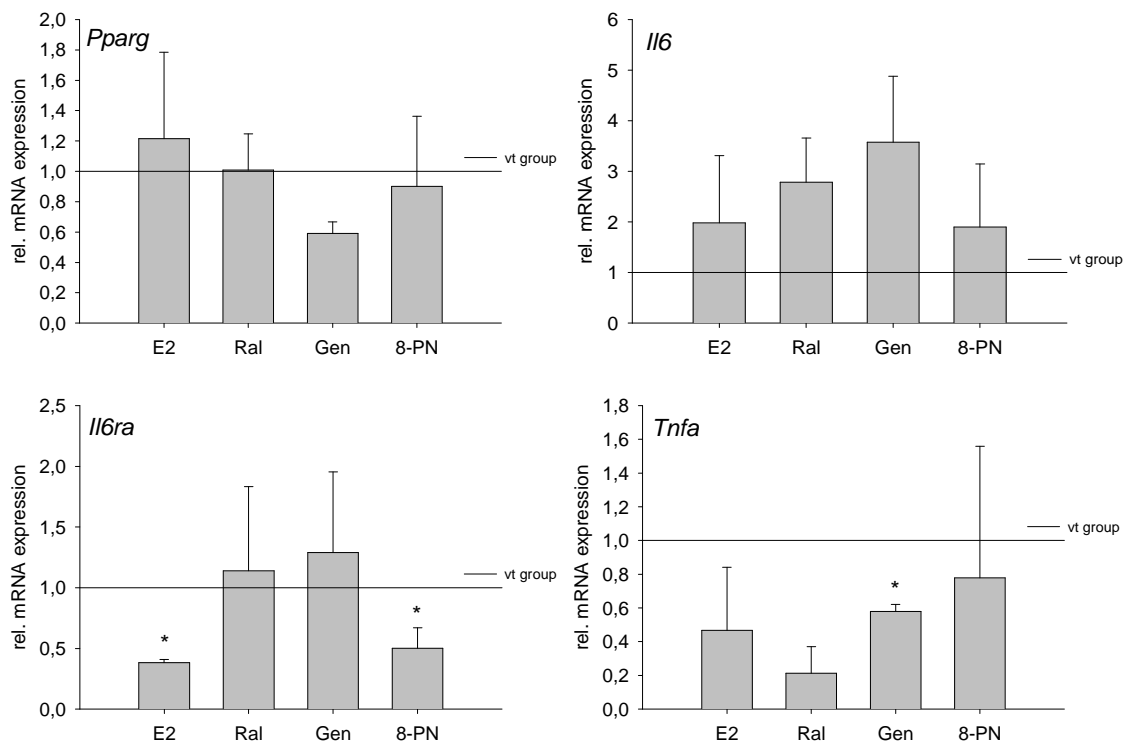


Abb. 8.2 Gene, die einen Link zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen im infrarenalen Fettgewebe

Die relative mRNA-Expressionsspiegel von *Pparg*, *Il6*, *Il6ra* und *Tnfa* nach der Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Alle Gene sind normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, für die statistische Analyse wurde der Students t-Test verwendet. *p ≤ 0,05

8.5 Leber TV 4

Die mRNA-Expression in der Leber nach der Gabe von E₂ zeigte eine erhöhte Expression des *Esr1*, aber keine veränderte Regulation von *Lepr* und *Insr*. Durch die Gabe von Raloxifen konnte dem *Esr1* keine veränderte Regulation nachgewiesen werden, während der *Lepr* ein 2-fach niedrigere und der *Insr* eine 5-fach niedrigere Expression nachweisbar

war, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der Behandlung mit Genistein zeigte sich beim *Lepr* eine erhöhte Expression, bei den Genen *Esr1* und *Insr* konnte keine veränderte Regulation der vehicle behandelten Gruppe festgestellt werden. In der Behandlungsgruppe welche mit 8-PN exponiert war, konnte bei allen drei Genen eine erhöhte Expression gemessen werden.

Gene die unter dem Einfluss des MetS und der Östrogendefizienz stehen, wie *Srebp* und *Insig1*, zeigten nach der Behandlung mit E_2 keine veränderte Regulation, lediglich bei *Insig2* konnte eine 2-fach niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 8.3).

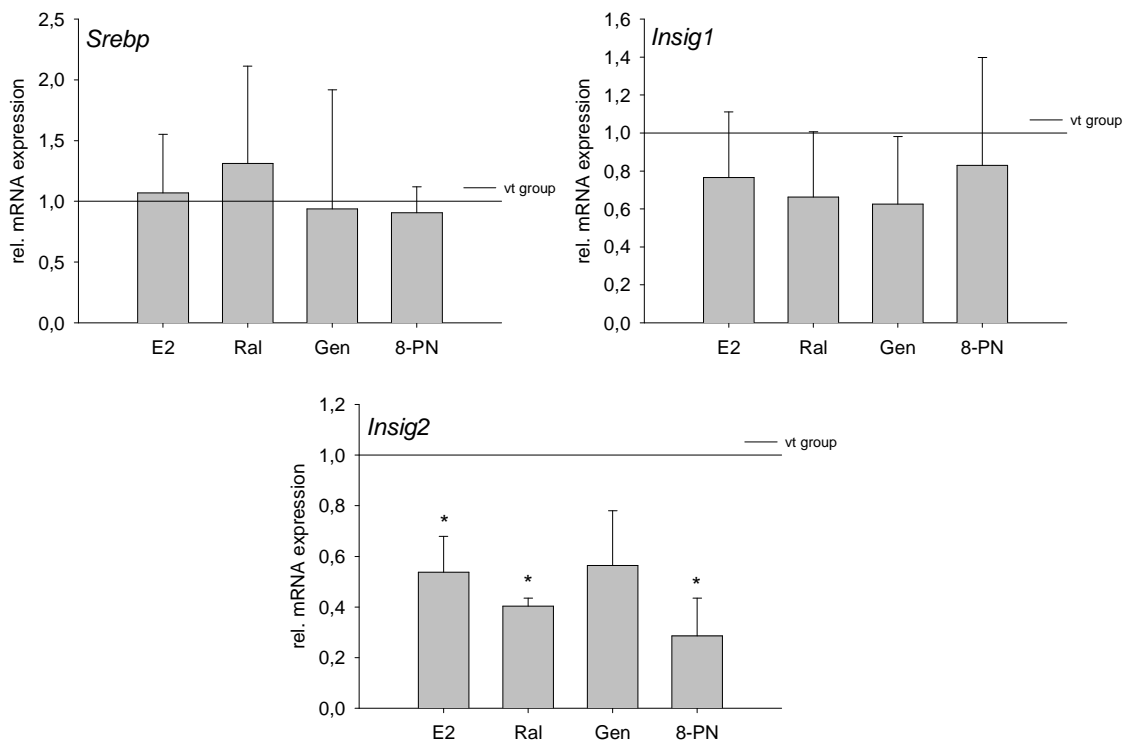


Abb. 8.3 Gene, die mit dem MetS verbunden sind in der Leber

Die relativen mRNA-Expressionsspiegel von *Srebp*, *Insig1* und *Insig2* nach einer 21-Tage-Behandlung mit E_2 , Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Alle Gene sind normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert \pm Standardabweichung, für die statistische Analyse wurde der Students t-Test verwendet. * $p \leq 0,05$

Während bei den Behandlungsgruppen von Raloxifen, Genistein und 8-PN für die Gene *Srebp* und *Insig1* keine veränderten Regulationen festgestellt wurden, konnte *Insig2* eine

niedrigere Expression aufweisen. Diese Beobachtung war in den Behandlungsgruppen von Raloxifen und 8-PN signifikant (Abb. 8.3).

Nach der Behandlung mit E₂ zeigte sich bei der mRNA-Expression von *Pparg*, *Il6* und *Il6ra* keine veränderte Regulation bezüglich der vehicle behandelten Gruppe (Abb. 8.4).

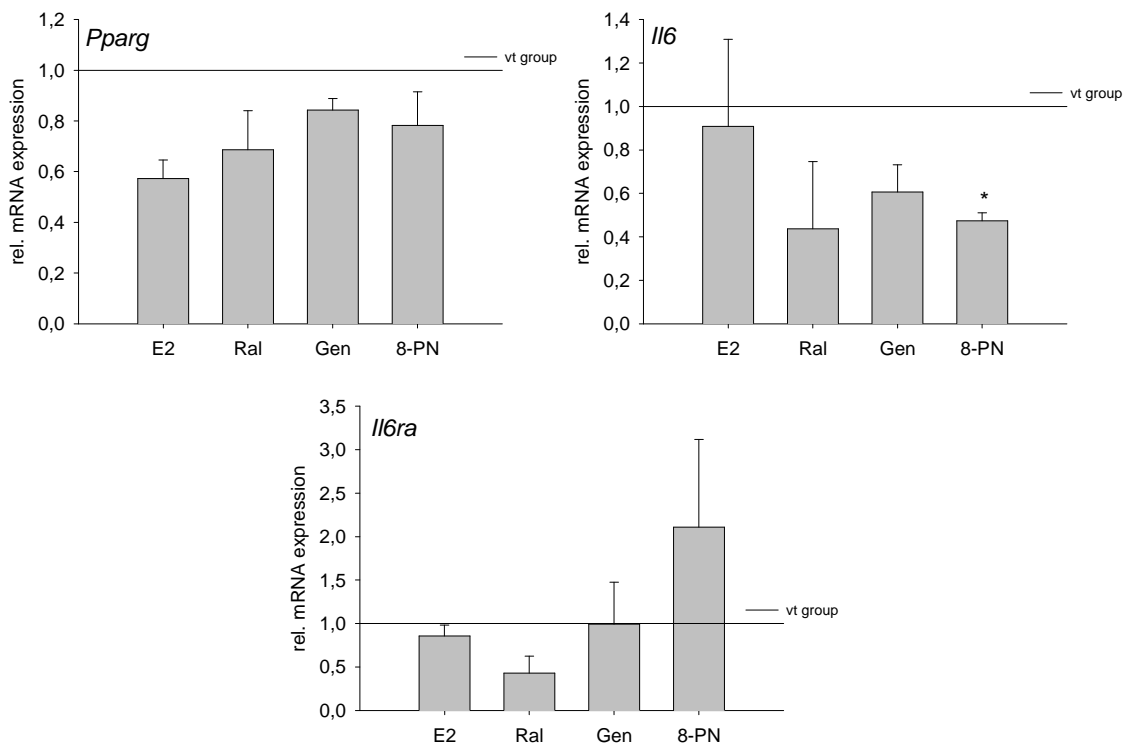


Abb. 8.4 Gene, die eine Verlinkung zwischen MetS und Östrogendefizienz darstellen in der Leber

Die relativen mRNA-Expressionssoiegel von *Pparg*, *Il6* und *Il6ra* nach einer 21 Tage-Behandlung mit E₂, Raloxifen (Ral), Genistein (Gen) und 8-PN von ArKO-Mäusen. Alle Gene sind normalisiert gegen die vehicle behandelte Gruppe (schwarze horizontale Linie). Die Daten sind dargestellt als Durchschnittswert ± Standardabweichung, für die statistische Analyse wurde der Students t-Test verwendet. *p ≤ 0,05

Der *Pparg* stellte sich in keiner Behandlungsgruppe regulatorisch verändert dar, verglichen mit der Kontrollgruppe. Beim *Il6* konnte eine 2,5-fach niedrigere Expression nach der Behandlung mit Raloxifen und 8-PN gezeigt werden, verglichen mit der Kontrollgruppe. Letztere Beobachtung war signifikant. Die Behandlung mit Genistein zeigte keine veränderte Regulation des *Il6* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls

keine Regulationsveränderung konnte nach der Behandlung mit Genistein beim Il6ra gezeigt werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beim Il6ra allerdings zeigten sich eine 2,5-fach niedrigere Expression nach der Behandlung mit Raloxifen und eine 2-fach höhere Expression nach der Behandlung mit 8-PN, gezogen auf die Kontrollgruppe.